

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

**CHARAKTERISIERUNG DER ISOTYPSPEZIFISCHEN
SYSTEMISCHEN UND LOKALEN ANTIKÖRPERANTWORT
GEGEN *YERSINIA ENTEROCOLITICA* BEI
EXPERIMENTELL INFIZIERTEN SCHWEINEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Melanie Hassel
aus Duisburg

Leipzig, 2008

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Andreas Hensel

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Andreas Hensel,
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig

2. Gutachter: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber,
Institut für Lebensmittelhygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig

3. Gutachter: PD Dr. habil. Heinrich Neubauer
Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena

Tag der Verteidigung: 04.03.2008

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Übersicht über die Spezies <i>Yersinia enterocolitica</i>.....	3
2.1.1 Bakteriologische Charakterisierung.....	3
2.1.2 Geschichte und Taxonomie	3
2.1.3 Geographische Verbreitung und Wirtsspezifität.....	6
2.2 <i>Y. enterocolitica</i> - Bedeutung beim Schwein	6
2.2.1 Verbreitung.....	6
2.2.2 Infektionswege	8
2.2.3 Kontamination im Schlachtbetrieb.....	9
2.2.4 Klinische Verlaufsformen.....	9
2.3 <i>Y. enterocolitica</i> - Bedeutung für den Menschen	10
2.3.1 Verbreitung.....	10
2.3.2 Klinische Verlaufsformen und Komplikationen	10
2.3.3 Infektionswege.....	12
2.4 Pathogenität von <i>Y. enterocolitica</i>.....	13
2.4.1 Pathogenese der Infektion	13
2.4.2 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren	14
2.4.3 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren	16
2.5 Diagnostik von <i>Y. enterocolitica</i>.....	17
2.5.1 Kulturelle und biochemische Nachweismethoden	17
2.5.2 Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion	18
2.5.3 Klassische serologische Nachweismethoden	19
2.6 Das Typ III-Sekretionssystem Gram-negativer Bakterien	20
2.6.1 Funktion und Vorkommen innerhalb tier- und pflanzenpathogener Bakterien	20
2.6.2 Struktureller Aufbau des Typ III Sekretionsapparates.....	20
2.7 Der Typ III Sekretionsapparat bei <i>Y. enterocolitica</i>	22
2.7.1 Aufbau und genetische Organisation.....	22
2.7.2 Sezernierte Proteine bei <i>Yersinia</i>	24
2.7.2.1 YopE	24
2.7.2.2 YopH.....	25
2.7.2.3 YopO/YpkA	26
2.7.2.4 YopT	27
2.7.2.5 YopP/YopJ	28
2.7.2.6 YopM	29
2.7.2.7 LcrV	30
2.7.3 Signale für Sekretion und Translokation	30
2.8 Yops als Grundlage moderner serologischer Diagnostik	32
3 Material und Methoden.....	35
3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau.....	35
3.2 Material und Methoden, Teil 1: Herstellung der rekombinanten Antigene.....	36
3.2.1 Bakterienstämme	36

3.2.2 Nährmedien zur bakteriellen Anzucht	36
3.2.3 Oligonukleotide	36
3.2.4 Restriktionsendonukleasen	37
3.2.5 Expressionsvektoren	38
3.2.6 Expressionsstämme	38
3.2.7 Bereits vorhandene exprimierende Klone	38
3.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	38
3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion	40
3.2.9.1 PCR-Bedingungen	40
3.2.10 Agarosegelelektrophorese	41
3.2.11 Restriktion und Ligation	41
3.2.12 Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation	42
3.2.13 Kultivierung und Induktion	43
3.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.2.15 Färbung der Polyacrylamid-Gele	44
3.2.16 Immunoblot	45
3.2.17 Proteinreinigung	45
3.2.17.1 Affinitätschromatographie	45
3.2.17.2 Elektroelution	47
3.3 Von der PCR zum gereinigten Protein: Zusammenfassung der Methoden zur Herstellung und Reinigung der rekombinanten Antigene	48
3.4 Material und Methoden, Teil 2:	
Herstellung von Hyperimmunseren und Immunoblots sowie Charakterisierung der Antikörperantwort gegen <i>Y. enterocolitica</i> beim Schwein	54
3.4.1 Bereits vorhandene Hyperimmunseren	54
3.4.2 Tiere und Probenmaterial	54
3.4.3 Verwendete Immunoblots	55
3.4.4 Herstellung der Immunoblots für Vorversuche	56
3.4.5 Herstellung der Teststreifen – Auflinierung der Yops	56
3.4.6 Infektionsmodell Schwein – Gewinnung verschiedener Proben	57
3.4.6.1 Gewinnung der Serumproben	57
3.4.6.2 Gewinnung der Speichelproben	57
3.4.6.3 Gewinnung der Tränenflüssigkeit	57
3.4.6.4 Gewinnung der Darmsekrete	58
3.4.6.5 Gewinnung der Synovia	58
3.4.7 Gewinnung von Hyperimmunseren	58
3.4.7.1 Immunisierung von Kaninchen	59
3.4.7.2 Immunisierung von Schweinen	59
4 Ergebnisse	64
4.1 Rekombinante Antigene	64
4.2 Ergebnis der Immunisierung der Schweine	66
4.3 Ergebnis der Immunisierung der Kaninchen	67
4.4 Charakterisierung der systemischen und lokalen Antikörperantwort nach der experimentellen Infektion	68
4.4.1 Vorversuch	68
4.4.2 Hauptversuch	69
4.4.2.1 Isotypspezifische systemische Antikörperantwort-Immunglobulin G	69
4.4.2.2 Isotypspezifische systemische Antikörperantwort-Immunglobulin A	72
4.4.2.3 Immunglobulin M	74
4.4.2.4 Isotypspezifische lokale Antikörperantwort-Immunglobulin G	75
4.4.2.5 Isotypspezifische lokale Antikörperantwort-Immunglobulin A	77

5 Diskussion	81
5.1 Herstellung der rekombinanten Antigene	82
5.1.1 Konstruktion geeigneter Oligonukleotide für die PCR	82
5.1.2 Möglichkeiten der Differenzierung pathogener Yersinien-Stämme durch YadA.....	83
5.1.3 Expressionssystem – Kombination von Vektor und Expressionsstamm	84
5.1.4 Optimierung der Expression.....	86
5.1.5 Reinigung der rekombinanten Antigene.....	87
5.2 Herstellung von Hyperimmunseren und Immunoblots sowie Charakterisierung der Antikörperantwort gegen <i>Y. enterocolitica</i> beim Schwein.....	90
5.2.1 Immunisierung	90
5.2.2 Charakterisierung der systemischen Antikörperantwort	92
5.2.3 Charakterisierung der lokalen Antikörperantwort.....	95
5.3 Fazit und Ausblick.....	97
6 Zusammenfassung	99
7 Summary	101
8 Literaturverzeichnis	103
Anhang.....	124

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Aqua dest	Aqua destillata
Aqua bidest	Aqua bidestillata
C	Cytosin
CIN-Agarmedium	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agarmedium
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland
DNA	Desoxyribo-nucleic-acid
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, Deutschland
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic-acid
EMBL	European Bioinformatics Institute, http://www.ebi.ac.uk
Fa.	Firma
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
invA	Invasin A
ISO	International Organisation for Standardization, Genf, Schweiz
ITC-Bouillon	Irgasan-Tircacillin-Kaliumchlorad-Bouillon
kb	Kilobasen
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
LB-Bouillon	Luria-Bertani-Bouillon
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NCBI	National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate puffered saline
pYV	plasmid for <i>Yersinia</i> virulence
RV-Medium	Rappaport-Vassiliadis-Medium
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
spec.	Spezies
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV-Licht	Ultraviolette Licht
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein

1 EINLEITUNG

Die mikrobiologische Sicherheit von Lebensmitteln ist von der Europäischen Union als ein bedeutendes öffentliches Gesundheitsziel festgelegt worden. Viele Zoonoseerreger werden durch Lebensmittel übertragen und/oder haben ihr Reservoir im Nutztier. Galt in den neunziger Jahren *Salmonella* spp. als hauptsächlicher Erreger der akuten Darminfektionen, übertrafen seit dem Jahre 1997 die Erreger der so genannten übrigen Formen der Enteritis infectiosa die gemeldeten Salmonellosen. Neben *Campylobacter jejuni*, Noro- und Rotaviren nimmt die Spezies *Y. enterocolitica* mit 6000 bis 8000 gemeldeten klinischen Fällen in den letzten Jahren in Deutschland einen wichtigen Platz in dieser Erregergruppe ein (ROBERT KOCH INSTITUT 2003, 2004, 2005). Erkrankungen durch den Zoonoseerreger *Y. enterocolitica* wurden mit der Einführung des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) im Jahre 2001 auch bundesweit meldepflichtig.

Die Spezies *Y. enterocolitica* gehört zusammen mit *Y. pestis* (Erreger der Pest) und *Y. pseudotuberculosis* sowie weiteren nicht pathogenen Yersinien zur Gattung *Yersinia*. Unter dem Begriff Yersiniose werden die gastrointestinalen Erkrankungen, hervorgerufen durch *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, zusammengefasst. Pathogene *Y. enterocolitica*-Stämme werden aus Tieren, vor allem aus dem Hausschwein, und sporadisch auch aus Gewässern isoliert. Nur wenige Bioserotypen von *Y. enterocolitica* werden mit Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht, als wichtigster Träger wurden klinisch gesunde Schweine identifiziert. Deshalb ist als potentielle Infektionsquelle für den Menschen rohes bzw. nicht durchgegartes kontaminiertes Schweinefleisch anzusehen. Es wurde gezeigt, dass es durch Kontaminationen beim Schlachtvorgang zur Verunreinigung des gesamten Schlachtkörpers kommen kann (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000b, NESBAKKEN et al. 2003). Die Symptome der Yersiniose reichen von selbstlimitierenden Enteritiden bis hin zu tödlich verlaufenden Septikämien bei Neugeborenen und immunsupprimierten Menschen (BOTTONE 1997).

Generell ist der mikrobiologische, selektive Nachweis pathogener *Y. enterocolitica*-Stämme mit großem zeitlichen und materiellen Aufwand verbunden (NEUBAUER et al. 2001). Aus diesem Grund gewinnt die Yersinien-Diagnostik mittels immunologischer Verfahren, wie Immunoblotting oder ELISA, zunehmende Bedeutung. Für die Humanmedizin wurden in den letzten Jahren spezifische, auf rekombinanten Proteinen basierende Testsysteme entwickelt.

Ein solches Testsystem in Form eines an das Reservoirtier Schwein adaptierten Nachweisverfahrens existiert bislang jedoch nicht. Da eine Infektion mit *Y. enterocolitica* beim Schwein klinisch zumeist asymptomatisch verläuft, gibt es bis heute nur wenige Daten über die Pathogenese der Erkrankung. Zudem ist der Verlauf der spezifischen humoralen Antikörperantwort beim Schwein unbekannt.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher in einem kontrollierten experimentellen Infektionsversuch mit *Y. enterocolitica* im Schwein die Bildung von spezifischem IgG, IgA und IgM sowohl im Serum

als auch lokal in Speichel, Tränenflüssigkeit, Synovia und Darmsekreten im Verlauf der Infektion untersucht werden. Als spezifische Antigene sollten dabei rekombinant hergestellte, plasmidkodierte Virulenzfaktoren, so genannte *Yersinia*-Outer-Proteins (Yops), eingesetzt werden.

Die Ziele dieser Arbeit waren daher einerseits die Herstellung und Reinigung rekombinanter Yops zur Entwicklung eines an das Schwein adaptierten, hoch spezifischen und sensitiven serologischen Testsystems auf der Basis von Immunoblots und andererseits die Charakterisierung der isotypspezifischen Antikörperantwort im Verlauf der einzelnen Infektionsstadien in einem kontrollierten, experimentellen Infektionsversuch mit *Y. enterocolitica* beim Schwein.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Übersicht über die Spezies *Yersinia enterocolitica*

2.1.1 Bakteriologische Charakterisierung

Yersinien sind Gram-negative, fakultativ anaerobe, alkalistabile, psychrophile, pleomorphe, begeißelte Stäbchenbakterien mit einer Länge von 1-6 µm und einer Breite von 0,5-0,8 µm. Sie sind Oxidase-negativ, Katalase-positiv und reduzieren Nitrat zu Nitrit. Der Guanin-Cytosin-Gehalt ihrer DNA liegt zwischen 46 mol% und 48,5 mol%. Mit Ausnahme von *Y. pestis* sind Yersinien bei 22-28 °C beweglich, bei 37 °C werden keine Geißeln mehr gebildet und die Beweglichkeit geht verloren (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990).

2.1.2 Geschichte und Taxonomie

Den ersten anerkannten Hinweis auf die Entdeckung von *Y. enterocolitica* gab es 1934 in den Vereinigten Staaten durch MCIVER und PIKE. Die Autoren beschrieben unter dem Namen *Flavobacterium pseudomallei* Withmore einen kleinen, Gram-negativen Kokkobazillus, den sie aus zwei Abszessen im Gesicht eines Farmers isolierten. Im Jahr 1939 wurden SCHLEIFSTEIN und COLEMAN vom New York State Department of Health auf das Isolat aufmerksam. Zusammen mit vier anderen Isolaten beschrieben sie es als ähnlich zu *Actinobazillus lignieri* und *Pasteurella pseudotuberculosis*. Da sich die mikrobiologischen Eigenschaften der fünf Isolate aber stark von den beiden genannten Spezies unterschieden und drei der fünf Isolate aus Darminhalt stammten, schlugen SCHLEIFSTEIN und COLEMAN den Namen *Bacterium enterocoliticum* vor.

VAN LOGHEM führte 1944 zu Ehren von Alexandre Yersin, dem Erstbeschreiber des Pestbazillus, das Genus *Yersinia* ein, aber erst 1964 ordnete FREDRIKSEN das *Bacterium enterocoliticum* unter dem Namen *Yersinia enterocolitica* der Familie der *Enterobacteriaceae* zu. Man stellte rasch fest, dass diese Spezies sehr heterolog war und nach biochemischen Untersuchungen sowie DNA-Verwandschaftsstudien wurden die *Y. enterocolitica*-like- Spezies seit 1980 in sieben eigenständige *Yersinia*-Spezies unterteilt: *Y. enterocolitica* sensu stricto (BERCOVIER et al. 1980a) und die apathogenen Spezies *Y. intermedia* (BRENNER et al. 1980), *Y. frederiksenii* (URSING et al. 1980), *Y. kristensenii* (BERCOVIER et al. 1980b), *Y. aldovae* (BERCOVIER et al. 1984), *Y. mollaretii* und *Y. bercovieri* (WAUTERS et al. 1988). Zusätzlich wurde die Spezies *Y. rhodei* (ALEKSIC et al. 1987) dem Genus eingegliedert. SPRAGUE und NEUBAUER konnten 2005 aufgrund phänotypischer und Sequenzunterschiede die Spezies *Y. aleksiciae* aus *Y. kristensenii* ausgliedern. Insgesamt besteht der Genus *Yersinia* damit aus 12 Spezies, von denen drei, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, für den Menschen pathogen sind (s. **Tab. 1**).

Tabelle 1: Spezies, Erstbeschreiber und Pathogenität der Gattung *Yersinia*

Spezies	Erstbeschreiber	Pathogenität
<i>Y. pestis</i>	(Yersin 1894, Lehmann u. Neumann 1896), van Loghem 1944	human- und tierpathogen
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	(Pfeiffer 1889), Smith u. Thal 1965	human- und tierpathogen
<i>Y. enterocolitica</i>	(Schleifstein u. Coleman 1939), Fredriksen 1964	human- und tierpathogen
<i>Y. ruckeri</i>	Ewing et al. 1978	fischpathogen
<i>Y. frederiksenii</i>	Ursing et al. 1980	apathogen, aus Umwelt, Mensch und Tier isoliert
<i>Y. intermedia</i>	Brenner et al. 1980	apathogen, aus Umwelt, Mensch und Tier isoliert
<i>Y. kristensenii</i>	Bercovier et al. 1980	apathogen, aus Umwelt, Mensch und Tier isoliert
<i>Y. aldovae</i>	Bercovier et al. 1984	apathogen, Umweltisolat
<i>Y. rhodei</i>	Aleksic et al. 1987	apathogen, aus Umwelt, Mensch und Tier isoliert
<i>Y. bercovieri</i>	Wauters et al. 1988	apathogen, Umweltisolat
<i>Y. mollaretii</i>	Wauters et al. 1988	apathogen, Umweltisolat
<i>Y. aleksiciae</i>	Sprague u. Neubauer 2005	apathogen, vormals zu <i>Y. kristensenii</i> gehörend

Amerikanische und europäische Stämme der Spezies *Y. enterocolitica* zeigen Sequenzunterschiede im 16S-rRNA-Gen (IBRAHIM et al. 1993, NEUBAUER et al. 1999), die jedoch 3 % und somit die Speziesgrenze nicht überschreiten. NEUBAUER et al. (2000) schlagen daher eine Unterteilung in die Subspezies *Y. enterocolitica* für die Isolate amerikanischen Ursprungs sowie *Y. enterocolitica* *palearctica* für die Isolate europäischen Ursprungs vor.

Die Spezies *Y. enterocolitica* blieb auch nach der Ausgliederung der *Y. enterocolitica*-like- Spezies eine heterogene Gruppe pathogener und apathogener Stämme. WAUTERS et al. (1987) formulierten daraufhin eine Einteilung in Biovare, die auf unterschiedliche Substratverwertung basiert und auch die Pathogenität berücksichtigt. Die als apathogen geltenden Umweltisolate finden sich im Biovar 1A, sie unterscheiden sich von den pathogenen Stämmen durch ihre stets positiven Reaktionen bei Äskulin-Hydrolyse und Salicinsäurebildung (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990). Das Biovar 1B enthält die humanpathogenen Stämme, die vor allem in den USA auftreten. Die in Europa vorkommenden humanpathogenen Stämme sind in die Biovare 2, 3 und 4 eingeordnet, während tierpathogene Stämme vor allem in die Biovare 3 und 5 gehören.

Tabelle 2. Phänotypische Einteilung von *Y. enterocolitica* in Biovare nach WAUTERS et al. (1987)

Testreaktion	Biovare					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipase-Aktivität	+	+	-	-	-	-
Äskulin-Hydrolyse	+	-	-	-	-	-
Salicin	+	-	-	-	-	-
Indol-Produktion	+	+	(+)	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	v
Trehalose	+	+	+	+	+	-
Pyrazinamidase-Aktivität	+	-	-	-	-	-
β-Glucuronidase	+	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer-Test	+	+	+	+	+	(+)
Prolinpeptidase	v	-	-	-	-	-

Inkubation bei 28 °C, 48 h

(+) = schwach positive Reaktion

v = variable Reaktion

Einmal ermittelte Biotypen lassen sich hinsichtlich Epidemiologie und Pathogenität weiterführend in Serovare differenzieren. Diese Einteilung beruht hauptsächlich auf Bestimmung der O-Antigene (spezifische Seitenketten des Lipopolysaccharids), seltener werden auch die H-Antigene (Geißelantigen) hinzugezogen. Für *Y. enterocolitica* einschließlich der früher als “*Y. enterocolitica*-like” bezeichneten Arten (*Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*) wurden bis heute 60 O-Gruppen gefunden, wovon 28 auf *Y. enterocolitica* entfallen (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990). **Tabelle 3** zeigt die Biovar/Serovar Kombinationen, die in Amerika und Europa als pathogen eingeordnet werden (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990, BOTTONE 1997).

Tabelle 3. Pathogene Biovar/Serovar Kombinationen der Spezies *Y. enterocolitica*

Biovar	Serovare
1B	O:4,32 ; O:8 ; O:13 ; O:18 ; O:20 ; O:21
2	O:9 ; O:5,27
3	O:1,2,3 ; O:5,27
4	O:3
5	O:2,3

Medizinisch besonders bedeutsam sind in Europa die Serogruppen in der Reihenfolge O:3, O:9 und O:5,27. In Nordamerika kommen vor allem O:8, O:13, O:20 und O:21 vor, wobei mittlerweile

Patientenisolate des „europäischen“ Serovar O:3 in den USA stark zugenommen haben und in ihrer Häufigkeit Biovar 1B-Isolate noch übertreffen (HEESEMAN 1994).

2.1.3 Geographische Verbreitung und Wirtsspezifität

Y. enterocolitica tritt weltweit in den gemäßigten und subtropischen Klimazonen Europas, Nord- und Südamerikas, Nord- und Ostasiens sowie in Australien und Südafrika auf. In den tropischen Gebieten Afrikas und in Südasien ist der Erreger eher selten (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990, DEDIE et al. 1993). Das Wirtsspektrum reicht dabei von nahezu allen warmblütigen Wild-, Nutz-, und Heimtieren bis hin zu Fischen, Schalentieren und Reptilien. Außerdem findet man *Y. enterocolitica* auch im Wasser und im Erdboden (DEDIE et al. 1993, BOTTONE 1997). Während die meisten Umweltisolate avirulent sind, wird insbesondere das Schwein vielfach als Reservoirtier für die humanpathogenen Serogruppen O:3, O:5,27, O:8 und O:9 angesehen (SCHIEMANN 1989, KAPPERUD 1991, BOTTONE 1999, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a, JONES 2003). In diesem Zusammenhang fällt auch auf, dass beispielsweise in arabischen Ländern, wo aus religiösen Gründen kein Schweinefleisch verzehrt wird, die Yersiniose nur eine geringfügige Rolle beim humanen Infektionsgeschehen spielt. Erkrankungen werden hier vor allem mit kontaminiertem Brunnen- und Tankwasser in Verbindung gebracht (NIMRI u. MEQDAM 2004). In letzter Zeit häufen sich außerdem Hinweise auf eine mögliche Pathogenität der bisher als apathogen eingestuften Biovar 1A-Isolate (TENNANT et al. 2003, MCNALLY et al. 2004). Der Bioserotyp 4/O:3 gilt weltweit als häufigster Verursacher der humanen Yersiniose (BOTTONE 1999).

2.2 *Y. enterocolitica* - Bedeutung beim Schwein

2.2.1 Verbreitung

Eine Vielzahl von Studien, besonders aus den europäischen Ländern und Nordamerika, befasste sich in den letzten Jahren mit der Prävalenz des Erregers im klinisch gesunden Schlachtschwein. Dabei konnte der Erreger typischerweise vor allem aus den Tonsillen, der Zunge, dem Darmtrakt und dem Kot der Tiere isoliert werden, wobei die teilweise hohe Besiedelungsrate der Tonsillen auffällig war (WAUTERS et al. 1979, CHRISTENSEN 1987, WAUTERS et al. 1988, DE BOER u. NOUWS 1991, DE GIUSTI et al. 1995, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999, THIBODEAU et al. 1999, BONARDI et al. 2003). Die Isolierungsrate aus den Tonsillen war oft bis zu sechsmal höher als aus den Fäzes (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000a, NESBAKKEN et al. 2003). In einem experimentellen Infektionsversuch konnten NIELSEN et al. (1996) nachweisen, dass *Y. enterocolitica* im Verlauf der Infektion länger aus den Tonsillen als aus dem Kot isolierbar ist. **Tabelle 4** gibt einen Überblick über die Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Tonsillen und Fäzes beim Schwein, basierend auf Ergebnissen von Studien aus den letzten 18 Jahren.

Tabelle 4. Prävalenz von *Y. enterocolitica* in Tonsillen und Fäzes beim Schwein
Berichte aus Europa und Kanada von 1988 bis 2003

Land	Anzahl Tonsillen	Anzahl Fäzes	Bioserotyp					Referenz
			4/O:3		2/O:9		O:5,27	
			To	Fä	To	Fä	To	
Belgien	54	n.u.	61,0%	-	0%	-	0%	Wauters et al. 1988
Dänemark	400	n.u.	37,0%	-	0%	-	0%	Christensen 1987
	n.u.	1458	-	25,0%	-	n.u.	-	Andersen 1988
Deutschland	465	465	16,3%	4,3%	n.u.	n.u.	n.u.	Atanassova u. Ring 1998
	50	50	60,0%	10,0%	0%	0%	0%	Fredriksson-Ahomaa et al. 2000a
Finnland	185	n.u.	32,0%	-	0%	-	0%	Fredriksson-Ahomaa et al. 2000c
Italien	106	n.u.	41,0%	-	2,0%	-	0%	De Guisti et al. 1995
	150	150	12,7%	2,7%	0%	0,7%	0%	Bonardi et al. 2003
Kanada	291	291	22,0%	6,0%	0,7%	0%	0,3%	Thibodeau et al. 1999
Niederlande	86	100	38,0%	16,0%	0%	1,0%	3,0%	De Boer u. Nouws 1991
Norwegen	461	n.u.	32,0%	-	0%	-	0,2%	Nesbakken u. Kapperud 1985
	24	24	62,5%	12,5%	n.u.	n.u.	n.u.	Nesbakken et al. 2003
	2272	2538	29,4%	16,9%	0,2%	0,1%	0,2%	

To = Tonsillen, **Fä** = Fäzes, **n.u.** = nicht untersucht

Der Bioserotyp 2/O:5,27 wurde in diesen Untersuchungen in Fäzes nicht nachgewiesen, daher keine eigene Tabellenspalte

Die vorliegenden Studien aus verschiedenen Ländern zeigen, dass vor allem *Y. enterocolitica* des Bioserotyps 4/O:3 im gesunden Schwein persistieren kann. Insbesondere die Zunahme der intensiven Haltung von Schlachtschweinen hat zur Verbreitung von *Y. enterocolitica* in den Beständen geführt. Im Jahr 2000 wurden an einem Schlachthof in München 50 Schlachtschweine bakteriologisch untersucht, dabei konnten in 60 % der Tonsillen und in 10 % der Kotproben *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachgewiesen werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000a). Allerdings variiert die Verbreitung des Erregers innerhalb der verschiedenen Herden; während der Untersuchung am Münchener Schlachthof konnten zumindest 4 der 19 verschiedenen Schweinebestände als negativ eingestuft werden. Bei ähnlichen Untersuchungen in Norwegen und Dänemark konnten SKJERVE et al. (1998) ca. ein Drittel der untersuchten Schweinepopulationen als seronegativ identifizieren. Flächendeckende Untersuchungen zur Prävalenz des Erregers in den Schweinebeständen Deutschlands liegen nicht vor. Allerdings konnten bisher vor allem Mastschweine als Ausscheider identifiziert werden. In vier verschiedenen Betrieben wurden zwischen 0 und 65,4 % *Y. enterocolitica*-positive Kotproben identifiziert, während die gleichen Tiere im Ferkel- und Läuferalter keine Yersinien ausschieden (GÜRTLER et al. 2005).

2.2.2 Infektionswege

Eine Infektion mit dem so genannten „foodborne pathogen“ *Y. enterocolitica* erfolgt bei Tier und Mensch überwiegend oral-alimentär. Dafür spricht der Nachweis des Erregers in den Tonsillen und im Kot von Keimträgern sowie die Lokalisation des Primäraffektes in der Darmschleimhaut. Das Bakterium wird zwischen den Tieren wahrscheinlich durch erregerehaltigen Kot und über die damit kontaminierte Umwelt übertragen (DEDIE et al. 1993, BOTTONE 1997). Neugeborene Ferkel infizieren sich leicht und entwickeln sich, zumeist sogar symptomlos, zu langfristig ausscheidenden, klinisch unauffälligen Trägern des Bakteriums in Mundhöhle und Darmtrakt (SCHIEMANN 1989).

Untersuchungen in dänischen Schweinebeständen zu Risikofaktoren auf Betriebsebene, die zu einer Ansteckung der Tiere führen könnten (SKJERVE et al. 1998, WINGSTRAND et al. 2001), ergaben, dass vor allem die Haltungsform selbst und die Art des Transportes zum Schlachthof ein erhöhtes Infektionsrisiko bergen können. Geschlossene Betriebssysteme ohne Zukäufe zeigten eine niedrigere Seroprävalenz als spezialisierte Schlachtschwein-Betriebe, die Ferkel aus verschiedenen Herden kaufen, wodurch offensichtlich eher ein häufiger Kontakt von nicht infizierten Schweinen zu Keimträgern ermöglicht wird. Werden Schweine im betriebseigenen Transporter zum Schlachthof gefahren, sind Kontaminationen durch das Milieu des Schlachthofes wahrscheinlich, vor allem wenn der Fahrer beim Ausladen der Tiere Zugang zu den unreinen Bereichen hat (SKJERVE et al. 1998). Außerdem wird diskutiert, dass Katzen, die mit ihren Jungen Zugang zu den Schweineställen haben, einen Risikofaktor darstellen, da auch sie als asymptomatische Träger in Frage kommen und den Erreger verbreiten können (WEBER u. LEMBKE 1981, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c).

Innerhalb des Schlachthofs wird *Y. enterocolitica* horizontal von Schwein zu Schwein übertragen. Die Infektion der Tiere kurz vor der Schlachtung kann über den Kot infizierter Ausscheider, in kontaminierten Transportfahrzeugen oder im Wartestall erfolgen (FUKUSHIMA et al. 1990). Ein weiterer wesentlicher Faktor könnte die Reaktivierung des Erregers durch Stress in latent infizierten Schweinen sein. Stresssituationen wie lange Transporte, hohe Temperaturen und Luftfeuchtigkeit, der ungewohnte Lärm und das Zusammentreiben auf dem Schlachthof, führen durch vermehrte Freisetzung von Katecholaminen und Glukokortikoiden letztendlich zu einer Translokation von Bakterien durch die Darmwand in Lymphknoten und andere Organe. SEIDEL et al. (2001) konnten diesen Zusammenhang bei Schlachtschweinen nachweisen: Stressbelastung, besonders lange Transporte von 7-8 Stunden, führten bei den untersuchten Schweinen zu gesteigerten Translokationsraten von Bakterien, erhöhten Endotoxinlevel und einer Verminderung der Bakterizidie des Serums. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch MARG et al. (2001) bei klinisch inapparent mit Salmonellen infizierten Schweinen. Bei ihrer Untersuchung lag die Ausscheidungsrate Salmonellen-infizierter Schweine nach einem achttündigen Transport mit 92 % deutlich höher als die Ausscheidungsrate von 52 % bei nicht transportierten Tieren.

2.2.3 Kontamination im Schlachtbetrieb

Die Infektkette „Mastschwein - kontaminiertes Schweinefleisch - Mensch“ ist durch Fallstudien in Belgien (TAUXE et al. 1987), Norwegen (OSTROFF et al. 1994) und Nordamerika (JONES et al. 2003) belegt. Im Wesentlichen ist dabei der in Deutschland eher unübliche Genuss von Schweine-Innereien oder die Verwendung von Kopffleisch mit Tonsillenresten zur Hackfleischherstellung betroffen, letzteres ist in Deutschland durch die geltende Hackfleischverordnung verboten. Trotzdem treten immer wieder humane Yersiniosen auf, ein Hauptgrund ist wahrscheinlich die Keimverschleppung bei der Verarbeitung der Schlachtkörper (KAPPERUD 1991, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000b, 2001b, NESBAKKEN et al. 2003). In Finnland und Süddeutschland wurden von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2000b, 2001b) auf einem Schlachthof Tupferproben von essbaren Innereien sowie von verschiedenen Oberflächen im Umfeld der Schlachtstätte auf *Y. enterocolitica* 4/O:3 untersucht. Die hohen Kontaminationsraten von Leber (38 %), Niere (86 %) und Herz (63 %) lassen sich sehr wahrscheinlich durch eine Keimverschleppung, ausgehend von Tonsillen und Zunge, erklären. Diese Organe werden zusammen als Geschlinge entnommen und zeigten in Untersuchungen mittels Pulsfeldgelelektrophorese alle ein identisches Banden-Muster mit den Isolaten aus den kolonisierten Tonsillen. Messer und Schlachtkörper waren ebenfalls kontaminiert, unter anderem waren auch PCR-Proben von Brustsäge, Geschlingehaken, Computer in der Fleischschau und Kaffeemaschine der Arbeiter positiv. In einer Studie von NESBAKKEN et al. (2003) wurde vor allem die Inzision der Lymphknoten in Unterkiefer und Mesenterium für die Keimverschleppung verantwortlich gemacht, von einem Schlachtkörper ließ sich nach der kurzen Berührung durch einen Fleischbeschauer *Y. enterocolitica* 4/O:3 isolieren.

Auch das manuelle Auslösen des Rektums birgt eine große Kontaminationsgefahr. Wird das Rektum nach dem Herauslösen aber in Plastik verpackt, kann die Kontamination des Schlachtkörpers deutlich minimiert werden (NESBAKKEN et al. 1994).

2.2.4 Klinische Verlaufsformen

Mit *Y. enterocolitica* kolonisierte Schweine gelten allgemein als asymptomatische Träger des Erregers, da eine Erkrankung eher abortiv bis subklinisch verläuft. Als Faktorenkrankheit tritt die Yersiniose vereinzelt beim Schwein mit fieberhaften Durchfällen und katarrhalischer bis diphteroider Enteritis auf, betroffen sind vor allem geschwächte Jungtiere unter ungünstigen Haltungsbedingungen (DEDIE et al. 1993). Bei experimentellen Infektionen durch NATTERMANN et al. (1986) litt die Hälfte der oral infizierten Ferkel an Durchfällen mit intermittierendem Fieber, außerdem konnten Lahmheiten, Hautveränderungen und Fruchtbarkeitsstörungen beobachtet werden.

Bei einer Studie von TZIPORI et al. (1987) entwickelte ein Teil der infizierten gnotobiotischen, neugeborenen Ferkel Enteritiden und Enterokolitiden verbunden mit Anorexie und Durchfall. Bei der oralen Gabe einer relativ niedrigen Dosis von 1×10^8 KBE *Y. enterocolitica* O:3 konnten dagegen THIBODEAU et al. (2001) keine klinischen Symptome bei Ferkeln auslösen.

2.3 *Y. enterocolitica* – Bedeutung für den Menschen

2.3.1 Verbreitung

Die humane Yersiniose wird als Zoonose hauptsächlich durch *Y. enterocolitica* verursacht, nur gelegentlich werden Isolate von *Y. pseudotuberculosis* für eine Erkrankung verantwortlich gemacht. Europaweit traten im Jahr 2003 10.086 Fälle, im Jahr 2004 10.381 Fälle von humaner Yersiniose mit positivem kulturellen Nachweis des Erregers und klinischen Symptomen auf (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY 2006). Allein zwei Drittel dieser Fälle werden aus Deutschland gemeldet. Man kann aber davon ausgehen, dass die Dunkelziffer deutlich höher liegt: bei den häufig nur milden Symptomen lassen sich nur wenige Personen ärztlich untersuchen, bei diesen Fällen werden nicht immer Stuhluntersuchungen durchgeführt und nicht alle diagnostizierten Erkrankungen werden gemeldet. In einigen nordischen Ländern wie Finnland und Norwegen ist die Yersiniose noch immer die dritthäufigste Ursache gastrointestinaler Infektionserkrankungen, auch in Deutschland steht sie an dritter Stelle der Häufigkeit von bakteriellen Erregern lebensmittelbedingter Infektionen (ROBERT KOCH INSTITUT 2004b). Das ursprüngliche, nur auf einige Bundesländer beschränkte Meldesystem wurde mit Einführung des Infektionsschutzgesetzes im Jahr 2001 geändert, die Yersiniose ist jetzt bundesweit meldepflichtig. Dass die tatsächliche Infektionsrate mit *Y. enterocolitica* höher als die Zahl der gemeldeten Fälle ist, lassen auch Studien zur Seroprävalenz des Erregers vermuten: gemäß MÄKI-IKOLA et al. (1997) wird die Prävalenz von *Y. enterocolitica* O:3/O:9 spezifischen Antikörpern in 100 untersuchten deutschen Blutspendern mit 43 % angegeben. Eine frühere Studie von WENZEL et al. (1988) ergab 34,5 % Anti-*Yersinia*-Antikörper bei 336 gesunden Blutspendern.

Neben dem dominierenden Bioserovar 4/O:3 berichtet das ROBERT KOCH INSTITUT (2002b) über das erstmalige Auftreten einer Infektion ausgelöst durch das amerikanische Bioserovar 1B/O:8 im Oktober 2001. Dieses Bioserovar war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in Deutschland aufgetreten, der Patient hatte auch keine Auslandsreise unternommen. Weitere Fälle in Verbindung mit diesem Bioserovar als „emerging pathogen“ folgten in den nächsten Jahren (ROBERT KOCH INSTITUT 2004c).

2.3.2 Klinische Verlaufsformen und Komplikationen

Die Yersiniose stellt sich klinisch überwiegend als ein pädiatrisches Problem dar. Eine belgische Studie, durchgeführt im Zeitraum von 1983 bis 1996, identifiziert vor allem Kinder der Altersstufe 1 bis 4 Jahre als Betroffene einer akuten Enterocolitis, da 56 % der erfassten Isolate aus dieser Altersgruppe stammen (VERHAEGEN et al. 1998). KOEHLER et al. (2006) untersuchten in der USA Fälle der Altersgruppe <5 Jahre, wobei 69 % der humanen Yersiniosen bei Kindern unter einem Jahr auftraten.

Die klinischen Erscheinungen der Yersiniose des Menschen lassen sich in eine enterale Verlaufsform sowie in eine septikämische und eine immunpathologische Verlaufsform unterteilen. Der enterale

Verlauf in Form einer Gastroenteritis ist mit einer Häufigkeit von 70 % das dominierende klinische Erscheinungsbild einer Infektion mit *Y. enterocolitica* (HOOGKAMP-KORSTANJE u. DE KONING 1990). Nach einer Inkubationszeit von 4 – 7 Tagen beginnt die Krankheit mit leichtem Fieber, Bauchschmerzen und Diarrhoe, gelegentlich tritt auch eine Pseudoappendizitis auf. Das Allgemeinbefinden ist in gleicher Weise wie bei anderen enteralen Infekten beeinträchtigt. Neben schweren Krankheitsbildern wie chronischer Ileitis und *Yersinia*-Colitis kommen auch leichte und subklinische Formen vor. Die Erkrankung ist in der Regel selbstlimitierend und klingt bei komplikationslosem Verlauf nach einigen Tagen ab (DEDIE et al. 1993). Immer wieder werden aber auch chronische Verläufe mit ständig wiederkehrenden Symptomen beschrieben. HOOGKAMP-KORSTANJE et al. (1988) bewiesen mittels indirekter Immunofluoreszenz bei diesen Infektionen die Persistenz des Erregers in der tiefen Darmmukosa und in Lymphknoten.

Der septikämische Verlauf tritt vergleichsweise selten auf, ist jedoch immer lebensgefährlich. Betroffen sind vorwiegend Kinder und ältere Menschen mit Immundefekten oder bestehenden Grundkrankheiten wie Diabetes, Leberzirrhose, Alkoholismus und Neoplasien. Auch eine medikamentöse (Desferrioxamin) oder krankheitsbedingte (Thalassämie, etc.) Eisenüberladung des Organismus kann Auslöser einer Sepsis sein. Bei einem hohen Eisenangebot im Blut können auch die Bioserovare ohne eigene hochpathogene Siderophoren das freie Eisen verstoffwechseln und sich septikämisch ausbreiten (BOTTONNE 1997). Klinisch äußert sich die septische Verlaufsform durch remittierendes oder kontinuierliches Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen (DEDIE et al. 1993).

Enterale Infektionen mit den Serogruppen O:3 und O:9 führen oft zu immunologisch induzierten Folgekrankheiten wie Reaktive Arthritis, Erythema nodosum, Glomerulonephritis und Myokarditis. Bei der Reaktiven Arthritis handelt es sich um eine postinfektiöse, nicht septische Arthritis, die durch eine extraartikuläre Infektion ausgelöst wird und bei der der ursächliche Erreger nicht lebend im Gelenk nachweisbar ist. Etwa 80 % aller Patienten mit postyersinialer Reaktiver Arthritis sind Träger des Histokompatibilitätsantigens HLA-B 27 (HOOGKAMP-KORSTANJE u. DE KONING 1990). Gerade die Serogruppe O:3, so fanden WUORELA et al. (1997) heraus, könne bei ihrer Phagozytose eine Reduzierung der Synthese der HLA-B 27-Epitope bewirken, so dass die Erkennung durch T-Zellen beeinträchtigt ist. Folglich kann die Verminderung der Epitope eine Eliminierung der Arthritis verhindern. Außerdem scheinen Yersinien dieser Serogruppe in der Lage zu sein, die präsentierten Peptide der HLA-B 27-Moleküle zu verändern und dadurch die autoimmune Arthritis auszulösen. SKURNIK (1995) vermutet weiterhin eine Beteiligung des Virulenzproteins YadA. Wird es auf der Oberfläche phagozytischer Zellen präsentiert, könnte es diese Zellen befähigen, Kollagen zu binden, wodurch dann eine Entzündung im Gelenk hervorgerufen werden kann. Symptomatisch äußert sich die Arthritis an den vorwiegend betroffenen Hand-, Zehen- und Kniegelenken mit Rötung, Schwellung, Schmerzen, eingeschränkter Funktion, Fieber und bisweilen auch Gelenksergüssen (DEDIE et al. 1993).

2.3.3 Infektionswege

Die orale Aufnahme pathogener Serovare von *Y. enterocolitica* erfolgt typischerweise über kontaminierte Lebensmittel, insbesondere über rohes bzw. nicht genügend durchgegartes Schweinefleisch. In Belgien, wo in den 80er Jahren eine hohe Yersiniose-Inzidenz in der Bevölkerung vorlag, konnten Tauxe et al. (1987) als wichtige Ursache den landesüblichen Verzehr von Gerichten, die mit rohem Schweinefleisch zubereitet werden, ermitteln. Für die Hackfleischherstellung wurde bei der Schlachtung häufig Kopffleisch entnommen, dem auch Tonsillengewebe und Backenschleimhaut anhängen. Zudem konnte auch hier eine Keimverschleppung bei der En-Block-Entnahme des Geschlinges und der Spaltung des Schlachtkörpers festgestellt werden. Die Lagerung von Hackfleisch oder rohen Würsten über längere Zeit in Kühlräumen ist in Belgien nicht verboten, wichtig ist in diesem Zusammenhang die Fähigkeit des Erregers, sich auch bei Temperaturen um 0 °C noch zu vermehren. Somit gelangte kontaminiertes Fleisch in den Handel. Mangelnde Küchenhygiene, nicht ausreichendes Durcherhitzen und das Verkosten von rohem Hack stellten daher ein großes Infektionsrisiko dar. Dank einer Aufklärungskampagne in den Medien zur Küchenhygiene und den Gefahren, die mit dem Genuss rohen Schweinefleisches verbunden sind sowie einer veränderten Schlachttechnik, konnte die Zahl der Krankheitsfälle durch *Y. enterocolitica* in den folgenden Jahren um die Hälfte reduziert werden (VERHAEGEN et al. 1998).

In den USA wurde der Verzehr rohen Schweinefleisches, hier vor allem Innereien, mit Ausbrüchen von Yersiniose in Verbindung gebracht. Die so genannten „chitterlings“, ein Traditionsgericht der Afroamerikaner, bestehend aus rohen Schweinedärmen, wurde 1991 von LEE et al. als Ursache mehrerer Krankheitsfälle benannt. JONES et al. (2003) fanden in einer Fallstudie heraus, dass Kleinkinder allein durch ihre Anwesenheit bei der Zubereitung dieser Schweinedärme im Haushalt erkranken können. Die stundenlange Reinigung und Verarbeitung der Würste in einer Küche mit spielenden Kindern führte z.B. aufgrund von Spritzwasser auf Babyflaschen und kontaminierten Händen der Mutter in zehn Fällen zum Ausbruch einer klinisch relevanten Yersiniose bei bis zu 1 Jahr alten Kindern.

In Griechenland traten gehäuft Erkrankungsfälle bei Kindern auf, wenn in den Wintermonaten traditionsgemäß geräucherte Würstchen aus Schweinefleisch und Innereien verzehrt wurden (GALANAKIS et al. 2006).

Auch in Deutschland ist der Verzehr von Produkten mit rohem Schweinefleisch in Form von Schweinemett oder Hackepeter üblich. HANK (2002) konnte bei Untersuchungen in Deutschland in 9 % aller untersuchten Hackfleischproben pathogene Yersinien nachweisen, in Muskelfleisch betrug die Nachweisrate 7,4 %. In sechs von acht Metzgereien in der Münchener Gegend fanden FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2004) pathogene Yersinien, sowohl auf den Schlachtkörpern als auch vor allem in rohem Schweinefleisch-Produkten. In 10 % solcher Produkte wiesen auch THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM (2005) mittels Multiplex-PCR pathogene Yersinien nach, zusätzlich fanden sie das Bioserovar 4/O:3 in Hundefutter.

In Rinder- oder Geflügelfleisch dagegen konnten auf Schlachthof-Ebene keine pathogenen Yersinien nachgewiesen werden (BUCHER et al. 2002a, 2002b).

Als weitere in Frage kommende Lebensmittel für eine Infektion werden vereinzelt Milchprodukte genannt (BOTTONNE 1997). Zwei Ausbrüche in New York mit 228 Fällen an einer Highschool im Jahr 1976 und 159 Fällen in einem Sommercamp im Jahr 1981 ließen sich auf Schokoladenmilch bzw. Milchpulver zurückführen. Dabei ist aber von einer nachträglichen Kontamination auszugehen, da Rohmilch in zahlreichen Untersuchungen nur apathogene *Y. enterocolitica*-Isolate enthielt und Rinder sehr wahrscheinlich kein Reservoir für den Erreger darstellen.

Eine andere und nicht zu vernachlässigende Form der Aufnahme pathogener Yersinien ist der Erhalt einer kontaminierten Bluttransfusion beispielsweise in der Unfallmedizin. Etwa 50 % aller Septikämien, die in klinischen Einrichtungen aufgrund einer Bluttransfusion auftreten, werden durch *Y. enterocolitica* verursacht, 61 % davon enden tödlich (KLEIN et al. 1997). Grund ist auch hier wieder die Psychrophilie der Bakterien, die ein Überleben und Vermehren in den gekühlten Blutkonserven ermöglicht. Außerdem können die Yersinien das von alternden Erythrozyten freigesetzte Eisen verwerten (STENHOUSE u. MILNER 1982) und zugesetzte Antikoagulanzen als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (LECLERCQ et al. 2005). Nach einer gastrointestinalen Infektion auftretende Bakteriämien können vom Blutspender gänzlich unbemerkt bleiben und so zur Kontamination des Transfusionsblutes führen (BOTTONNE 1997). LECLERCQ et al. (2005) berichteten über einen Vorfall, bei dem die Blutspenderin 3,5 Monate vor der Spende lediglich an einem leichten Bauchschmerz ohne Erbrechen, Fieber oder Diarrhoe litt. Der Empfänger verstarb kurz nach dieser Transfusion an einer Sepsis durch *Y. enterocolitica* 4/O:3, die Spenderin wies nachträglich einen sehr hohen Antikörpertiter gegen dieses Serovar auf.

2.4 Pathogenität von *Y. enterocolitica*

2.4.1 Pathogenese der Infektion

Mit Hilfe von Infektionsmodellen bei Mäusen, Ratten und Kaninchen sowie Studien an bestimmten Zelllinien wurde ein Einblick in die Mechanismen der *Yersinia*-Infektion gewonnen.

Die Besiedlung des Darmtraktes ist dabei das vorrangige Ziel enterischer Krankheitserreger. Um dieses Stadium zu erreichen, müssen die mit der Nahrung aufgenommenen Yersinien vom Darmlumen aus die Mukusschicht über den Epithelzellen durchdringen, um schließlich an der Bürstensaummembran der Darmzellen haften zu können. PAERREGAARD et al. (1991) konnten zeigen, dass sich die Mukus-umhüllten Yersinien in dieser Matrix stark vermehrten, indem sie entweder das Muzin selbst oder andere Komponenten des Mukus metabolisierten. Die Erreger lokalisieren sich im terminalen Ileum an ihrer bevorzugten Eintrittspforte, den M-Zellen, die die

Peyerschen Platten überziehen (BOTTONE 1997). Die Penetration der M-Zellen wird durch die Invasionsgene *inv*, *ail* und bei plasmidtragenden Yersinien auch durch *yadA* vermittelt.

Es folgt die Besiedlung der Peyerschen Platten, wobei HANSKI et al. (1989) mittels Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie bewiesen, dass die Peyerschen Platten 1000 x mehr kolonisiert waren als das umliegende Epithel. Die hochpathogenen amerikanischen Serovare (O:8, O:13) zerstören nun die Architektur dieses lymphatischen Gewebes, gelangen ungehindert in die Lamina propria, vermehren sich dort extrazellulär, breiten sich in den mesenterialen Lymphknoten und Organen wie Leber, Milz und Nieren aus und vermehren sich auch dort unter Abszessbildung (HANSKI et al 1989, HEESEMANN 1990). Die europäischen pathogenen Serovare (O:3, O:9) zeigen einen gleichen Verlauf, die Keimzahl in den Organen nimmt dann jedoch schnell ab und die Krankheit heilt aus (DEDIE et al. 1993). Nicht pathogene Yersinien können ebenfalls die M-Zellen durchqueren, werden dann aber ohne Zerstörung der histologischen Struktur der Peyerschen Platten von Makrophagen eliminiert (BOTTONE 1997).

Für den Ablauf der Infektion ist demnach das Vorhandensein von Virulenzfaktoren, die das Eindringen, Überleben und Vermehren der Bakterien fördern, von großer Wichtigkeit. Man unterscheidet dabei chromosomale von plasmidkodierten Virulenzfaktoren.

2.4.2 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren

Das *inv*-Gen kodiert für Invasin, ein 92 kDa großes Protein der äußeren Membran, welches der wichtigste und primäre Invasionsfaktor der virulenten Yersinien zu sein scheint. Es ist für die effiziente Translokation der Bakterien durch das intestinale Epithel bei Mäusen erforderlich, eine *inv*-Deletionsmutante ist nicht in der Lage, zu Beginn einer Infektion die Peyerschen Platten ausreichend stark zu besiedeln (PEPE u. MILLER 1993). Obwohl alle Yersinien ein *inv*-Gen besitzen, können nur die enteropathogenen Stämme auch ein funktionsfähiges Protein synthetisieren (CARNIEL 1995). Normalerweise wird Invasin bei Temperaturen unter 28 °C und neutralem pH-Wert maximal exprimiert. Bei einem pH-Wert von 6,0, ähnlich den Werten im Dünndarm, wird auch bei 37 °C die gleiche Expressionsrate erreicht (PEPE et al. 1994).

Der zweite Adhärenz- und Invasionsfaktor ist das Membranprotein Ail. Exprimiert wird es vom Attachment-invasive-locus-Gen, welches nur in pathogenen Yersinien vorkommt (MILLER et al. 1989). Ail-Deletionsmutanten dringen zwar in die Darmmukosa der Maus ein, werden aber innerhalb von zwei Tagen eliminiert (PEPE et al. 1995). Außerdem ist das Protein für die Resistenz der Yersinien in humanem Serum erforderlich (BLISKA u. FALKOW 1992, PIERSON u. FALKOW 1993).

Bei den HPIs (high pathogenicity islands) handelt es sich um Regionen auf dem Chromosom, die mehrere Virulenzgene umfassen. Ein besonders wichtiges HPI kodiert für ein Eisenaufnahmesystem in Form der Siderophore Yersiniabactin und kommt nur in hoch virulenten Stämmen der Biovar 1B,

sowie bei *Y. pseudotuberculosis* vor (PELLUDAT et al. 2002). Diese Stämme besitzen somit die Fähigkeit, die für ihre Vermehrung notwendigen Eisenionen effizient aus dem Serum aufzunehmen, das nur sehr wenig freies Eisen enthält.

Das *yst*-Gen wiederum kodiert für ein Protein, das zu dem hitzestabilen Enterotoxin (STI) von *E. coli* strukturell und funktionell homolog ist (DELOR u. CORNELIS 1992). Über die Steigerung des cGMP-Levels führt die Aktivität des Yst wahrscheinlich zu einer Flüssigkeitsansammlung im Darm (TAKAO et al. 1985, DELOR u. CORNELIS 1992). Trotzdem wird die Beteiligung von Yst am Durchfallgeschehen kontrovers diskutiert. Gegen eine Rolle als Virulenzfaktor sprechen die Tatsachen, dass Yst hauptsächlich unterhalb einer Temperatur von 30 °C synthetisiert wird, dass es im Darminhalt an Diarrhoe erkrankter Tiere nicht nachgewiesen werden kann und in Ferkeln und Mäusen keinen Durchfall auslöst (CARNIEL 1995). Für eine Virulenzeigenschaft spricht aber, dass nahezu alle klinischen Isolate das Toxin sezernieren (PAI u. MORS 1978), dass bei Osmolaritäts- und pH-Werten ähnlich denen im Ileum auch bei 37 °C die Syntheserate hoch ist (MIKULSKIS et al. 1994) und dass eine Yst-Deletionsmutante im Gegensatz zum Wildtyp bei jungen Kaninchen keinen Durchfall auslösen konnte (DELORS u. CORNELIS 1992).

Auch die Gene für die Synthese der Lipopolysaccharide (LPS), den Hauptkomponenten der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, sind auf dem Chromosom lokalisiert. Die Lipopolysaccharide setzen sich aus drei Teilen zusammen: Lipid A, Oligosaccharidkern und O-Seitenkette (O-Antigen). Das Lipid A ist, wie bei anderen Gram-negativen Bakterien auch, in der Entstehung der bakteriellen Sepsis und der Induktion febriler Prozesse involviert. Die O-Antigene sind ebenfalls für die volle Virulenz von *Y. enterocolitica* verantwortlich (AL-HENDY et al. 1992). Eine Mutante des Synthese-Operons der O-Antigene verursachte einen 100-fachen Anstieg der LD₅₀ bei Mäusen (ZHANG et al. 1997).

Y. enterocolitica gehören zu den Urease-positiven Bakterien, somit produzieren diese Bakterien das Enzym Urease. Dieses Enzym ist durch den Urease-Genkomplex (*ure*) auf dem Chromosom kodiert (DE KONING-WARD et al. 1994). Die Urease katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniak und Kohlensäure. Der dadurch erreichte Anstieg des pH-Wertes ist für den Erreger besonders bei der Magenpassage und in anderem sauren Milieu von Vorteil (DE KONING-WARD u. ROBINS-BROWNE 1995). Auch GRIPENBERG-LERCHE et al. (2000) berichteten von einer deutlichen Abnahme der Virulenz nach oraler Infektion von Ratten mit Urease-negativen Mutanten.

2.4.3 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren

Humanpathogene Yersinien besitzen zusätzlich zum Chromosom ein ca. 70 Kilobasen großes Plasmid mit der Bezeichnung pYV, das so genannte „plasmid for *Yersinia* virulence“ (GEMSKI et al 1980, PORTNOY et al. 1981). Die Gene auf diesem Plasmid kodieren für Proteine, die unerlässlich für die Pathogenität des Erregers sind, avirulente Stämme besitzen kein Plasmid (HEESEMAN et al. 1983, SKURNIK et al. 1983). Neben den Genkomplexen für den Typ III-Sekretionsapparat (*ycs*-Gene) sind vor allem die Yops und das Adhärenzprotein YadA wesentliche, plasmidkodierte Virulenzfaktoren.

BÖLIN et al. entdeckten 1982 das Gen *yadA*, das für das Membranprotein *Yersinia* adhesin A, früher bezeichnet als Protein 1, kodiert. Wie bei allen Genen des Plasmids ist auch bei *yadA* die Expression temperaturreguliert und erfolgt nur bei 37 °C. Man nimmt demzufolge an, dass das chromosomal kodierte Invasin das erste Eindringen der Bakterien in die M-Zellen des Darmes vermittelt, während das Protein YadA nach Anpassung an die Körpertemperatur des Wirtes gebildet und vor allem zur Adhäsion in infiziertem Gewebe gebraucht wird (HOICZYK et al. 2000). Die Größe des Proteins variiert stammabhängig zwischen 41 und 44 kDa (SKURNIK u. WOLF-WATZ 1989). Im Gegensatz zu den Yops ist zur Expression kein Ca²⁺-armes Medium erforderlich, YadA wird auch in Anwesenheit von Calcium exprimiert (BÖLIN et al 1982, MICHIELS et al. 1990). Mittels Elektronenmikroskopie konnten KAPPERUD et al. (1987) beobachten, dass YadA die Oberfläche des Bakteriums fibrillenartig überzieht. HOICZYK et al. (2000) beschrieben die Struktur als eine Art Stiel mit verdicktem Kopf (Lollipop structure). YadA besteht hauptsächlich aus drei Domänen, denen jeweils spezifische Aktivitäten des multifunktionellen Proteins zugeordnet werden können. Der C-Terminus verankert das Molekül an der Bakterienoberfläche, sorgt für die grundsätzliche Stabilität und ist entscheidend für die Oligomerisation. Die äußerste N-terminale Spitze der „Lollipops“ ist beteiligt an der Bindung polymorphkerniger Leukozyten und verhindert dadurch Abwehrmechanismen wie z.B. den oxidativen Burst (ROGGENKAMP et al. 1996). Ein weiterer Abschnitt dieser Domäne ist wichtig für die Autoagglutination, die Bindung von Kollagen und die Adhärenz an Basalmembranen oder extrazellulären Matrixproteinen (TAMM et al. 1993). Gleichzeitig wird die Bindung an Darmmukosa via Kollagen und Laminin gefördert (SKURNIK et al. 1994). Mutanten ohne diese Domäne sind avirulent, was die Bedeutung der YadA-vermittelten Adhärenz an eukaryotische Zellen für die Virulenz von Yersinien unterstreicht. Weitere Funktionen des Proteins sind die Vermittlung der Bindung an Bürstensaum-Epithelien (PAERREGAARD et al. 1991) und die Serumresistenz. Letztere ist möglicherweise bedingt durch die Fähigkeit des Proteins, die Oberfläche des Bakteriums dicht zu ummanteln und dadurch das LPS als Angriffsziel für Komplementfaktoren und Defensine regelrecht zu maskieren (SKURNIK et al. 1999).

Bei den Yops handelt es sich nicht, wie ursprünglich angenommen, um Membranproteine, sondern um sezernierte Proteine. Kommt es nun während einer Infektion zum Kontakt zwischen Erreger und Wirtszelle, werden die Yops vom extrazellulär verbleibenden Bakterium über den Typ III-

Sekretionsapparat in die anhaftende Wirtszelle eingeschleust, wo sie ihre destruktive Wirkung ausüben. Bisher sind sechs Effektor-Yops mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 80 kDa identifiziert worden. Vier weitere Yops unterstützen die eigentliche Translokation, werden aber nicht oder nur ohne offensichtliche essentielle Funktionen in die eukaryotische Zelle verbracht (CORNELIS 1998). In der Übersicht über das Typ III-Sekretionssystem von *Y. enterocolitica* unter Punkt 2.7.2 werden die Funktionen der einzelnen Yops und ihr Beitrag zu den Abwehrmechanismen des Erregers vertieft.

2.5 Diagnostik von *Y. enterocolitica*

2.5.1 Kulturelle und biochemische Nachweismethoden

Welches kulturelle Nachweisverfahren in der Routine angewendet wird, ist bis heute vom Untersuchungsmaterial abhängig. Generell gilt, dass zumeist nur die Kombination mehrerer Kultivierungsverfahren eine zufriedenstellende Sensitivität in der Routinediagnostik gewährleisten kann (ALDOVA et al. 1990).

Lediglich der Nachweis aus Stuhlproben von Enteritis-Patienten gelingt meistens bereits durch einen Direktausstrich auf festem Selektivnährboden (PAI et al. 1979, VAN NOYEN et al. 1987). Zum Einsatz kommt dabei vor allem der modifizierte Salmonella-Shigella-Agar SSDC mit Natriumdesoxycholat und Kalziumchlorid (WAUTERS 1973) sowie der von SCHIEMANN (1979) entwickelte Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar (CIN). Die zugesetzten Hemmstoffe in diesen Nährböden unterdrücken selektiv das Wachstum anderer, unerwünschter Keime. Bei mehreren Vergleichsstudien konnte gezeigt werden, dass CIN-Agar der am stärksten selektive Nährboden für *Yersinia*-Spezies ist (HEAD et al. 1982, WALKER u. GILMOUR 1986, COX u. BAILEY 1990). Auf diesem Nährmedium zeigen Yersinien nach 24 bis 48 h bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C ein typisches Wachstum (SCHIEMANN 1989): Die Kulturen pathogener Isolate sind ca. 1 mm groß, besitzen ein rotes Zentrum und eine klare, farblose Umrandung in typischer „Kuhaugenform“.

Bei stark kontaminiertem Untersuchungsmaterial vom Tier oder aus der Umwelt sind in der Regel spezifische Anreicherungsverfahren notwendig. Bei der Kälteanreicherung in 0,15 molarer phosphatgepufferter Kochsalzlösung über 14 Tage oder mehr bei 4 °C macht man sich die Psychrophilie der Yersinien zunutze, da das Wachstum der Begleitflora verlangsamt wird, nicht aber das der Yersinien. Ein großer Nachteil ist allerdings die gleichzeitige Anreicherung apathogener Yersinien (VAN NOYEN et al. 1980).

Als erfolgreichste selektive Anreicherungsbouillons werden das modifizierte Rappaport-Medium (MRB – Inkubation bei 22 bis 29 °C über 2 bis 4 Tage) von WAUTERS (1973) und das Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Medium (ITC – Inkubation bei 24 °C über 48 h) von WAUTERS et al. (1988) beschrieben. Sie zeigen die höchste Selektivität für die Serovare O:3 und O:9. Bei Fleisch und

Lebensmittelprouben, aber auch zur Untersuchung von Fäzes, kann eine Vorbehandlung mit 0,25 %iger Kalilauge die Begleitkeimbelastung reduzieren. Die Alkalitoleranz von *Y. enterocolitica* konnte erstmals von AULISIO et al. (1980) festgestellt werden. Nach der Anreicherung kann dann auf CIN-Agar oder SSDC-Agar ausplattiert werden.

Für die Untersuchung aus Lebensmitteln oder Futter wurde aus einer Vielzahl von verfügbaren Methoden ein normierter Untersuchungsgang entwickelt, das so genannte Internationale Standardverfahren (ISO 10273) zum Nachweis mutmaßlich pathogener Yersinien (ANONYMUS 1994). Zur Anwendung kommt hier eine Anreicherung in PBS (Inkubation 2 bis 3 Tage bei 22 bis 25 °C), wahlweise mit Laugenbehandlung, oder in ITC, anschließend wird auf CIN- bzw. SSDC-Platten ausgestrichen. Eine weitere Referenzmethode bietet das Nordic Committee On Food Analysis (NCFA). Der Unterschied zur ISO 10273 besteht im verwendeten Anreicherungsmedium: Während bei der ISO-Methode ITC benutzt wird, kommt hier MRB zum Einsatz, zusätzlich schaltet die Methode des NCFA eine Kälteanreicherung vor (NCFA 1996).

Die weitere Differenzierung der auf festen Nährböden gewachsenen Kolonien erfolgt biochemisch auf Kligler-Agar (Eisen-III-Zucker-Schrägagar). Verdächtige Stämme sind Glukose-positiv, Laktose-negativ, zeigen keine Gasbildung und sind H₂S-negativ. Durch Bio- und Serotypisierung kann abschließend eine weitere Diskriminierung innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* vorgenommen werden.

2.5.2 Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion

Der diagnostische Nachweis von *Y. enterocolitica* und die Prüfung auf Pathogenität kann auch mittels Polymerasekettenreaktion, kurz PCR, durchgeführt werden. Detektiert werden mit dieser Methode spezifische Gene plasmidkodierter oder chromosomal kodierter Virulenzfaktoren (NEUBAUER et al. 2001). Dabei können in kurzer Zeit auch kleinste Mengen an DNA nachgewiesen werden, was zu einer höheren Sensitivität beiträgt. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. zeigten beispielsweise bei der Untersuchung von Hackfleisch (1999) sowie Schlachtkörpern und Geschlinge vom Schwein (2000b), dass mittels einer auf dem *yadA*-Gen basierenden PCR die Prävalenz pathogener Isolate deutlich höher war als bei Untersuchungen mit kulturellen Methoden.

Zum Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln, klinischem Material und Umweltproben wurden in den letzten Jahren verschiedenste PCR-Verfahren entwickelt. Die Zielgene sind oft die gleichen, die Methoden unterscheiden sich im Wesentlichen durch die jeweilige Probenaufbereitung. Geeignete plasmoidale Zielgene sind beispielsweise *virF*, *yadA* oder auch *yopT* (WREN u. TABAQCHALI 1990, KAPPERUD et al. 1993, ARNOLD et al. 2001). Basierend auf diesen plasmidgebundenen Virulenzgenen kann die Pathogenität eines Isolates überprüft werden, da nur pathogene Yersinien ein solches Virulenzplasmid tragen. Im Falle eines Verlustes des Virulenzplasmides, z.B. durch mehrere Subkultivierungen, kommt es allerdings zu falsch-negativen Ergebnissen. Deshalb werden bei der PCR häufig Primer plasmid-kodierter Gene mit Primern für

chromosomale Virulenzgene kombiniert (NEUBAUER et al. 2001). Oft verwendete chromosomale Zielsequenzen sind vor allem *ail*, *inv* und *yst*, wobei das *ail*-Gen bisher nur in pathogenen *Y. enterocolitica* gefunden wurde und damit besonders geeignet erscheint (KWAGA et al. 1992, NEUBAUER et al. 2001). Eine Multiplex-PCR von THISTED LAMBERTZ und DANIELSSON-THAM (2005) amplifiziert die Gene *ail*, *yst*, *rfbC* und *virF*, wodurch *Y. enterocolitica* O:3 Serovare, pathogene Nicht-O:3 Serovare und *Y. pseudotuberculosis* voneinander unterschieden werden können. Ein neuer Ansatz ist auch die Detektion durch real-time PCR: WOLFFS et al. (2004) kombinierten statt vorhergehender DNA-Aufreinigung eine Flotationsmethode mit ihrer quantitativen PCR und konnten so auch in Fleischsäften oder Fäzes *Y. enterocolitica* nachweisen.

Für biochemisch bereits als dem Genus *Yersinia* zugehörig eingestufte Isolate eignet sich auch das 16S rRNA-Gen als PCR-Grundlage. Die hochvariable Region 181 bis 193 dient zur Spezieszuordnung eines Isolates, während die konservierte Region 451 bis 480 eine Zuordnung zu den Subspezies *enterocolitica* oder *paleartica* ermöglicht (NEUBAUER et al. 2000).

2.5.3 Klassische serologische Nachweismethoden

Als klassische serologische Methoden zur Diagnostik einer Yersinien-Infektion gelten der Widal-Agglutinationstest und die Komplementbindungsreaktion (KBR). Grundlage beider Verfahren ist eine Antigen-Antikörper-Bindung, wobei Vollzellpräparationen bzw. bakterielles LPS als Antigene dienen. Die KBR rückt zunehmend in den Hintergrund, sie erfasst vor allem die zu Beginn einer Infektion auftretenden IgM-Antikörper und liefert daher nur ein schmales diagnostisches Fenster (LANGER 2002), außerdem ist sie zeitintensiv und durch die Vielzahl der Reaktionsteilnehmer störanfällig.

Bei der Widal-Reaktion weist man Antikörper gegen Bakterienantigene durch deren Agglutination nach, es kommt zu einer mit dem Auge sichtbaren Verklumpung. Im Serum von Patienten kann so das Vorhandensein von agglutinierenden Antikörpern gegen inaktivierte Oberflächenantigene der verschiedenen Serovare von *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden, vorzugsweise werden O-Antigene der Serovare O:3, O:9 und O:5,27 verwendet. Die Reaktion wird mit einer Reihe von Serumverdünnungen durchgeführt, z.B. 1:40; 1:80; 1:160 usw., die höchste Serumverdünnung, bei der es noch zur Agglutination kommt, gibt den Antikörper-Titer des untersuchten Serums an. Titer über 1:160 sind diagnostisch als positiv zu werten (WIRSING VON KÖNIG u. VON KÖNIG 1988). Mit dem technisch einfachen Widalttest kann zwar eine Diagnostik auf Serovarebene erfolgen, eine Differenzierung der Antikörperklassen ist aber nicht möglich. Aufgrund der Form der Immunglobuline ist allerdings ein IgM-Antikörper mit zehn Antigenbindungsstellen ein wesentlich effektiveres Agglutinin als ein IgG-Antikörper mit zwei Bindungsstellen (WIRSING VON KÖNIG u. VON KÖNIG 1988). Aus diesem Grund sind auch der Diagnostik mittels Widal-Agglutination Grenzen gesetzt. Signifikante Titer können in der Regel nur während der akuten Phase der Erkrankung bei Durchfallpatienten erfasst werden, die Titer sinken dann meist innerhalb von drei Monaten (HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 1988). Für postinfektiöse Komplikationen wie die Yersinien-

Arthritis ist die Sensitivität des Tests daher zu gering. Ein weiterer Nachteil ist die Kreuzreaktivität der O-Antigene des bakteriellen LPS (CAROFF et al. 1984). Derartige Kreuzreaktionen bestehen vor allem zwischen O:9 und Brucellen, *E. coli* O:157, Salmonellen sowie *Vibrio cholerae* (HEESEMANN u. KARCH 1995). Nutzt man dagegen diagnostisch die plasmidkodierte und ausschließlich vom Typ III-Sekretionssystem der Yersinien ausgeschleusten Yops als Immunogene, umgeht man diese Antigengemeinschaft und damit falsch-positive Ergebnisse.

2.6 Das Typ III-Sekretionssystem Gram-negativer Bakterien

2.6.1 Funktion und Vorkommen innerhalb tier- und pflanzenpathogener Bakterien

Die Architektur der Zellhülle Gram-negativer Bakterien bedingt, dass beim Proteintransport vom Inneren der Zelle nach außen einige Barrieren überwunden werden müssen: erst die innere Membran, der periplasmatische Raum, eine Peptidoglykanschicht und dann die äußere Membran. Dementsprechend haben Bakterien verschiedene Typen von Sekretionssystemen entwickelt, die sich in Komplexität, Abhängigkeit von Signalsequenzen im Protein und im stufenweisen Ablauf der Sekretion unterscheiden (WINSTANLEY u. HART 2001). Dabei ist das Typ III-Sekretionssystem das komplexeste und am höchsten spezialisierte Proteinsekretionssystem, um toxische Effektoren vom bakteriellen Zytosol in das Zytosol der Zielzelle zu transportieren. Die sezernierten Effektoren beeinflussen oder blockieren zelluläre Prozesse im Wirt, bis die Abwehrmechanismen zerstört sind und nachfolgend eine bakterielle Infektion etabliert werden kann.

Diese Art von Sekretionssystem konnte innerhalb verschiedener tier- und pflanzenpathogener Bakterien identifiziert werden, darunter *Yersinia* spp., *Shigella flexneri*, *Salmonella* spp., enteropathogene *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia* spp. und *Bordetella pertussis* sowie in den pflanzenpathogenen Bakterien *Erwinia* spp., *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas campestris* (HUECK 1998).

Innerhalb dieser verschiedenen Genera weisen die hochkonservierten Strukturproteine des Sekretionsapparates hohe Sequenzhomologien auf, dagegen unterscheiden sich die sezernierten Proteine (Effektormoleküle) der einzelnen Bakterien stark in ihren Eigenschaften wie Wirkung und Pathogenität.

2.6.2 Struktureller Aufbau des Typ III-Sekretionsapparates

Typ III-Sekretionssysteme haben einige charakteristische Merkmale: es liegt kein spaltbares Signalpeptid im sezernierten Protein vor, der Kontakt zur Wirtszelle ist für die vollständige Aktivierung des sekretorischen Pfades nötig, und der Export von Proteinen erfolgt durch eine Art

Sekretionskanal, der durch alle Membranen hindurch das Zytosol des Erregers mit dem der Zielzelle verbindet (HUECK 1998, FRANCIS et al. 2002).

Alle bisher bekannten Typ III-Sekretionssysteme teilen eine Anzahl von Strukturkomponenten, die einen einheitlichen Aufbau ermöglichen. Diese Strukturproteine lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, zum einen die Proteine der äußeren Membran mit diversen Lipoproteinen sowie einem Protein, das Sequenzähnlichkeit mit der Familie der Sekretine aufweist und zum anderen die integralen Membranproteine mit ihrer großen Ähnlichkeit zu den Komponenten des Flagellen-Export-Apparates (GALAN u. COLLMER 1999). Im Jahre 1998 konnten KUBORI et al. die supramolekulare Struktur des Typ III-Sekretionssystems in *Salmonella enterica* Typhimurium mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen als exemplarisches Beispiel aufdecken. Aufgrund der Homologien zwischen den Strukturproteinen ging man von einer weitgehend einheitlichen Gestalt des Sekretionsapparates aus, spätere elektronenmikroskopische Aufnahmen der Sekretionssysteme bei *Shigella flexneri* (BLOCKER et al. 2001) und *Y. enterocolitica* (HOICZYK u. BLOBEL 2001) bestätigten dies.

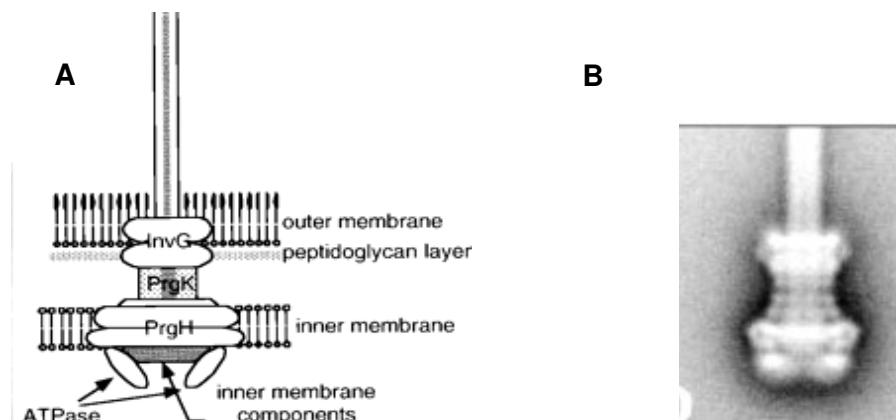


Abbildung 1. Darstellung von Sekretionsapparaten

(A) Schematische Darstellung des Sekretionsapparates mit den vermuteten Komponenten bei *S. enterica* (GALAN u. COLLMER 1999) sowie (B) elektronenmikroskopische Aufnahme des Sekretionsapparates bei *Shigella flexneri* (BLOCKER et al. 2001).

Der Sekretionsapparat wird auch als Nadelkomplex bezeichnet. Er erstreckt sich über die innere und äußere Membran und besteht aus zwei klar unterscheidbaren Formen, der zylindrischen Basis und der nadelförmigen Struktur. Die zylindrische Basis ähnelt dem Basalkörper des Flagellenapparates und verankert den Nadelkomplex in der Membran des Bakteriums, während die nadelähnliche Struktur aus der Zelle herausragt. SUKHAN et al. (2001) untersuchten den zeitlichen Ablauf der Bildung des SP1-Sekretionsapparates bei Salmonellen und stellten fest, dass sich dieser in vier Stufen unterteilt. Zuerst bilden sich die inneren Ringe der Basis in der zytoplasmatischen Membran, dann der periplasmatische Kanal und zuletzt die äußeren Ringe. Diese Strukturen stellen gleichzeitig die „Proteinexportmaschine“ dar, ohne die die abschließende Formation der Nadel nicht möglich wäre.

2.7 Der Typ III-Sekretionsapparat bei *Y. enterocolitica*

2.7.1 Aufbau und genetische Organisation

Aus den zahlreichen Studien der letzten Jahre über Operone des Ysc (*Yersinia* secretion) -Apparates (MICHIELS et al. 1991), Sequenz- und Mutationsanalysen der einzelnen Ysc-Gene (ALLAOUI 1994, 1995; BERGMANN et al. 1994; FIELDS et al. 1994; PLANO u. STRALEY 1995; STAINIER et al. 1997; IRIARTE u. CORNELIS 1999) sowie Vergleiche mit den verwandten Sekretionsapparaten von *Salmonella* Typhimurium (KUBORI et al. 1998, 2000; KIMBROUGH u. MILLER 2000) und *Shigella flexneri* (BLOCKER et al. 2001) hat man heute eine klare Vorstellung vom Sekretionsapparat der Yersinien, die durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der nadelförmigen Strukturen von *Y. enterocolitica* durch HOICZYK und BLOBEL (2001) bekräftigt werden konnte.

In Übereinstimmung mit der konservierten Struktur der Typ III-Sekretionssysteme besteht auch der Sekretionsapparat der Yersinien aus einer Art Basalkörper, der sich durch die Peptidoglycan-Schicht und die zwei bakteriellen Membranen erstreckt sowie einer nadelförmigen Struktur, die aus dem Bakterium hinausragt. Noch vor dem Kontakt mit der eukaryotischen Zielzelle wird dieser äußere nadelförmige Teil des Sekretionsapparates auf der Oberfläche von Yersinien, die bei 37 °C, also der Körpertemperatur ihres Wirtes, inkubiert werden, in großer Anzahl exprimiert (**Abbildung 2 A und B**).

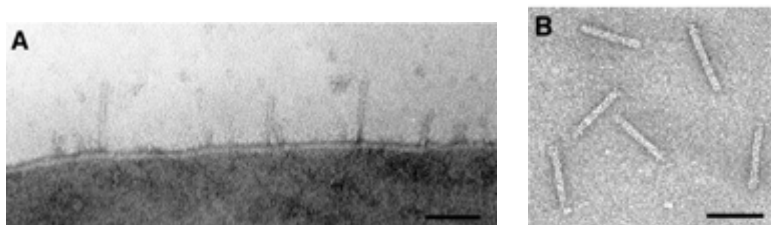


Abbildung 2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nadeln des Sekretions-systems von *Y. enterocolitica*.

(A) Nadelstrukturen auf der Zelloberfläche von *Y. enterocolitica* und (B) Nadeln in isolierter Form (HOICZYK u. BLOBEL 2001).

Der gesamte Sekretionsapparat besteht aus 27 Proteinen, von denen ungefähr 1/3 homolog zu bakteriellen Flagellenproteinen sind (HUECK 1998, AIZAWA 2001). In beiden Systemen bilden diese homologen Proteine den innenliegenden Basalkörper.

Zu den Gerüstproteinen des Basalkörpers gehören YscD, YscR, YscS, YscT, YscU und YscV, die Kontakt zur zytoplasmatischen Membran des Bakteriums haben. Die Lokalisation als Proteine der inneren Membran und die Beteiligung an Sekretion und Translokation der Effektorproteine konnten für YscD (PLANO u. STRALEY 1995), YscR (FIELDS et al. 1994), YscU (ALLAOUI et al. 1994) und YscV (PLANO et al. 1991) bereits gezeigt werden. Die Sequenzen von YscS und YscT weisen ebenfalls auf eine Verankerung in der inneren Membran hin.

Das Fundament für den externen Teil des auch als Injektisom bezeichneten Sekretionsapparates bildet das zur Familie der Sekretine gehörende Protein YscC, welches in der äußeren Membran des Bakteriums lokalisiert ist. YscC stellt einen sehr stabilen multimeren Komplex mit einer ringförmigen Struktur und einer zentralen Pore von ca. 50 Å bzw. 5 nm Durchmesser dar (KOSTER et al. 1997), es weist keine Verwandtschaft zu Flagellenproteinen auf und dient deswegen als wichtiges Unterscheidungsmerkmal.

Der externe Teil, also die eigentliche Nadel, wird durch die Polymerisation von ca. 200 bis 300 Kopien des gleichen Proteins, YscF, geformt. Die Nadel erreicht eine Länge von ca. 58 nm, bei einem äußeren Durchmesser von 6 bis 7 nm und einem inneren Durchmesser von ca. 2 nm. Das Protein YscP bestimmt die genaue Länge der Nadel, angepaßt an die Länge der Adhesine oder LPS-Komponenten an der Bakterienoberfläche. Ist die endgültige Nadellänge erreicht, interagiert YscP wahrscheinlich mit dem Protein YscU aus dem Basalkörper, YscF wird nicht mehr exprimiert und stattdessen wird YscP zu einem Signalgeber für die Yop-Sekretion bei Kontakt zwischen Nadelspitze und eukaryotischer Zellmembran (MOTA et al. 2005, AGRAIN et al. 2005).

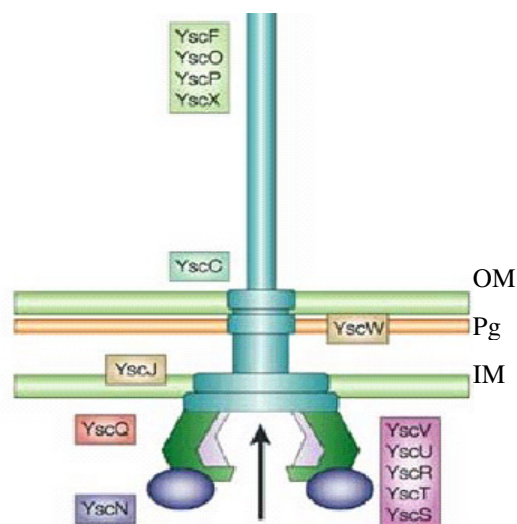


Abbildung 3. Schema des Injektisoms (CORNELIS 2002)

Neben YscF werden YscO und YscX als unterstützende Strukturproteine für die Nadelformation angesehen. YscP kontrolliert die Länge, YscC bildet mit YscW den externen Ring in der äußeren Membran (OM) und der Proteoglycanschicht (Pg), während YscJ den Ring in der inneren Membran (IM) formt. YscV, U, R, T und S stellen das Gerüst des Basalkörpers dar, YscN wird als möglicher Energielieferant angesehen.

Die Gene für den Sekretionsapparat sind bei Yersinien auf einem Virulenzplasmid kodiert, apathogene Yersinia-Stämme besitzen ein solches Plasmid nicht. Ähnlich den Pathogenitätsinseln auf dem Chromosom anderer Typ III-sekretionsfähiger Bakterien sind auch hier die kodierenden Gene in einem Cluster gruppiert. Die Anordnung der Gene YscIJKL und YscNOPQRSTU in zwei Blöcken ist bei den äquivalenten Genen in einem Großteil der Typ III-Sekretionssysteme gleich. Man vermutet daher, dass die Typ III-Sekretionssysteme in kompletten genetischen Blöcken erworben wurden, allerdings kann es auch beträchtliche Variationen geben (WINSTANLEY u. HART 2001).

Die Inaktivierung eines jeglichen Ysc-Gens unterbindet die Sekretion der Effektormoleküle (DAY u. PLANO 2000).

2.7.2 Sezernierte Proteine bei *Yersinia*

Pathogene Yersinien sezernieren mit den Yops eine Reihe von spezifischen Effektormolekülen. MICHIELS et al. entdeckten 1990, dass es sich bei diesen Proteinen jedoch nicht, wie bisher angenommen, um Membranproteine handelt, sondern dass diese vielmehr auf einem bisher unbekannten Weg in das umgebende Medium sezerniert werden. Im Jahr 1991 gelang es der Arbeitsgruppe um ROSQVIST et al., YopE als erstes Protein mit zytotoxischer Wirkung auf Säugetierzellen in zellfreien Kulturüberständen von *Yersinia* nachzuweisen. Sie stellten gleichzeitig ein Konzept der Typ III-Sekretion-Translokation auf, das 1994 durch konfokale Fluoreszenzbilder (ROSQVIST et al.) und Reporter-Enzym-Assays (SORY et al.) bewiesen werden konnte. Mittlerweile sind sechs reine Effektorproteine bekannt, weitere sezernierte Proteine unterstützen die Translokation der Yops.

Nach dem Eintritt in die eukaryotische Zelle blockieren die Yops verschiedene Signalkaskaden und hemmen die Reaktionsfähigkeit der Zelle auf eine Infektion. Von den sechs bisher identifizierten Effektoren beeinträchtigen vier, YopE, YopH, YopT und YopO, die Dynamik des Zytoskeletts der infizierten Zelle (CORNELIS 2002). Dadurch tragen sie zu der ausgeprägten Resistenz pathogener Yersinien gegen Phagozytose durch Makrophagen (ROSQVIST et al. 1990, BLISKA u. BLACK 1995, GROSDENT et al. 2002) sowie durch polymorphe Leukozyten (VISSER et al. 1995, ANDERSSON et al. 1999, GROSDENT et al. 2002) bei. Fehlt bei *Y. enterocolitica* nur eines dieser vier Yops, werden die Bakterien viel effizienter phagozytiert. Trotz unterschiedlicher Aktionen in der Säugetierzelle gibt es also scheinbar eine Synergie zwischen den Effektorproteinen (GROSDENT et al. 2002).

Effektor-Yops unterstützen die Resistenz eindringender Yersinien und ihre extrazelluläre Replikation nicht nur durch Blockade der Phagozytose sondern auch durch Verminderung der Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Adhäsions-Moleküle (SCHULTE et al. 1996, BOLAND u. CORNELIS 1998, DENECKER et al. 2002). Die Blockade der proinflammatorischen Antwort der Zielzelle wird hauptsächlich durch YopP und YopH ausgelöst.

2.7.2.1 YopE

YopE ist ein 23 kDa großes Protein mit einer N-terminalen Sekretionsdomäne von 15 Aminosäuren und einer Translokationsdomäne von 50 Aminosäuren (SORY et al. 1995). Im Jahr 1990 fanden ROSQVIST et al. heraus, dass bakterielle Deletionsmutanten ohne YopE für Mäuse weniger virulent sind als ein Stamm des Wildtyps. In vitro äußerte sich die Zytotoxizität in einer Abrundung der Wirtszellen, gleichzeitig lösten sich die Zellen von der extrazellulären Matrix. Weitere

Untersuchungen von ROSQVIST et al. (1991) zeigten, dass YopE eine Zerstörung der Aktin-Mikrofilamente bewirkt. Da Aktin durch seine Fasern und Filamente die Form der Zelle aufrechterhält und für die Zellproliferation bei der Phagozytose nötig ist, sorgt die Destruktion des Aktin-Zytoskeletts für Phagozytoseresistenz und zellulären Amorphismus (BLEVES u. CORNELIS 2000, BLISKA 2000).

Eine Anzahl bakterieller Exotoxine zerstören Aktin, indem sie kleine GTP-bindende Proteine (GTPasen) der Rho-Familie beeinflussen. Die RhoGTPasen Rac, Cdc42 und Rho sind zentrale Regulatoren der Aktinpolymerisation, je nach gebundenem Nukleotid, GTP oder GDP, sind sie aktiv oder inaktiv. Der Austausch von GTP und GDP wird z.B. durch GTPase aktivierende Proteine, sogenannte GAPs katalysiert (BLISKA 2000). YopE weist Sequenzhomologien zu den Toxinen ExoS und SptP von *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* auf, deren GAP-Aktivität schon länger bekannt ist (GOEHRING 1999, FU u. GALAN 1999). Kurze Zeit später konnten BLACK und BLISKA (2000) sowie VON PAWEL-RAMMINGEN et al. (2000) nachweisen, dass auch YopE mittels einer solchen GAP-Aktivität die GTP-Hydrolyse beschleunigt und somit zur Inaktivierung von RhoGTPasen führt. Essentiell für diese Reaktion ist ein Arginin-Finger-Motiv. Ersetzt man Arginin durch Alanin, verliert YopE seine GAP-Aktivität und damit auch seine antiphagozytotische Funktion (VON PAWEL-RAMMINGEN et al. 2000). In vitro inaktiviert YopE die RhoGTPasen Rho, Rac und Cdc42 gleichermaßen, in vivo wird nach ersten Studien von ANDOR et al. (2001) Rac favorisiert. Rac ist in die Sekretion von Interleukin-1 β involviert, mit der Inaktivierung von Rac verhindert YopE die Freisetzung des proinflammatorisch wichtigen Interleukins (SCHOTTE et al. 2004).

2.7.2.2 YopH

YopH ist ein 51 kDa großes Protein mit einer N-terminalen Sekretionsdomäne von 17 Aminosäuren und einer Translokationsdomäne von 71 Aminosäuren (SORY et al. 1995). Wie YopE hat auch YopH einen antiphagozytotischen Effekt auf Makrophagen und polymorphe Leukozyten (FALLMAN et al. 1995, ANDERSSON et al. 1996, GROSDENT et al. 2002), aber die Angriffspunkte in der Zielzelle sind bei beiden grundsätzlich verschieden. Bei YopH handelt es sich um eine hochaktive Phosphotyrosin-Phosphatase (ZHANG et al. 1992), deren wesentlicher Bestandteil die Aminosäure Cystein an Position 403 zu sein scheint. Mutationen in Cys403 verwandeln YopH in ein inaktives Enzym (GUAN u. DIXON 1991).

In Säugetierzellen sind Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen wichtig für die Signaltransduktion, die viele fundamentale zelluläre Funktionen, wie Phagozytose und Zellteilung, kontrolliert (LODISH et al. 1995). YopH greift in diese Signalübermittlung zwischen Integrin-Rezeptoren und Zytoskelett ein, indem es die Proteine p130^{Cas} (Crk associated tyrosine kinase substrate), FAK (focal adhesion kinase), Paxillin und FYB (Fyn-binding protein) dephosphoryliert (BLACK u. BLISKA 1997, PERSSON et al. 1997, HAMID et al. 1999). Diese Proteine sind in so genannten „focal adhesions“, submembranösen Komplexen, organisiert und dienen als eine Art Transmitter zwischen Rezeptor und Rho-GTPasen

(LO u. CHEN 1994, SCHÖNWÄLDER u. BURRIDGE 1999). Durch die YopH-vermittelte Dephosphorylierung werden diese Adhäsionskomplexe und mit ihnen die Signalübermittlung gestört. Folglich sind die Makrophagen in ihrer Phagozytosefähigkeit beeinträchtigt, während nicht phagozytierende Zellen die Fähigkeit zur Invasin-vermittelten Aufnahme von Bakterien verlieren (BLACK u. BLISKA 1997, PERSSON et al. 1997). Die Interaktion von YopH verläuft extrem schnell, bereits 30 Sekunden nach Kontakt zwischen Bakterium und Makrophage ist die Dephosphorylierung sichtbar (ANDERSSON et al. 1996). Außerdem greift YopH in die Signalkaskade für die Aktivierung des oxidativen Burst bei Makrophagen (BLISKA u. BLACK 1995) und Neutrophilen (RUCKDESCHSEL et al. 1996) ein, wodurch die Bildung bakterienschädlicher freier Sauerstoffradikale verhindert wird. Welche Proteine dabei dephosphoryliert werden, ist noch nicht bekannt.

Die anti-inflammatorische Wirkung des Proteins stellt sich wie folgt dar: YopH wirkt hemmend auf die Synthese von MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1) in infizierten Makrophagen, durch den Verlust des Chemokins werden weniger neue Makrophagen an den Ort der Infektion gelockt. Diese Hemmung kommt durch eine Blockade der Phosphatidylinositol-3-Kinase zustande (SAUVONNET et al. 2002b). Der PI3K-Signalweg kontrolliert außerdem die Zellproliferation. YAO et al. (1999) konnten eine YopH-abhängige Abnahme der Lymphozytenproliferation beobachten. T-Zellen, die kurzfristigen Kontakt zu *Y. pseudotuberculosis* hatten, produzierten keine Zytokine mehr, während bei B-Zellen die Expression von CD86 an der Oberfläche beeinträchtigt war.

2.7.2.3 YopO/YpkA

YopO, bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* als YpkA bezeichnet, ist ein 81 kDa großes Protein mit einer N-terminalen Sekretionsdomäne innerhalb der ersten 77 Aminosäuren (IRIARTE et al. 1998). GALYOV et al. (1993) demonstrierten, dass es sich bei YpkA um eine autophosphorylierende Seronin/Threonin-Proteinkinase mit Virulenzfaktoreigenschaften handelt, da Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp bei Infektionsversuchen eine abgeschwächte Mausvirulenz zeigten. Im Gegensatz zu YopE und YopH wird YopO/YpkA nur in geringem Maße vom Wildtyp in die Wirtszelle injiziert, wo es vorzugsweise an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist (HAKANSSON et al. 1996). Auch die morphologischen Veränderungen in infizierten HeLa-Zellen unterscheiden sich von denen, die durch YopE und YopH hervorgerufen werden. Die Zellen runden sich zwar ab, lösen sich aber nicht von der extrazellulären Matrix (HAKANSSON et al. 1996, GROSDENT et al. 2002). YopO kann seine Kinase-Aktivität erst entfalten, wenn es in der eukaryotischen Zelle angekommen ist und dort aktiviert wird. JURIS et al. (2000) fanden heraus, dass dieser Aktivator das zelluläre Aktin ist. YopO interagiert aber nicht nur mit Aktin, sondern auch mit den RhoGTPasen RhoA und Rac. In der Folge ist ein zerstörtes Aktin-Zytoskelett und reduzierte Mengen der GTPase RhoA feststellbar (DUKUZUMUREMYI et al. 2000). Allerdings greift YopO nicht wie YopE in die GTP/GDP-Austauschreaktion ein, der genaue Mechanismus seiner Wirkung auf

das Aktin-Zytoskelett sowie der Substrate *in vivo* ist allerdings noch unbekannt (DUKUZUMUREMYI et al. 2000).

2.7.2.4 YopT

YopT wurde erst 1998 von IRIARTE und CORNELIS als neues, 35,5 kDa großes Effektorprotein beschrieben. Der Grund für die relativ späte Entdeckung dieses neuen Yops ist seine schwache Expression, nur in einer Polymutante (Δ YopH, O, P, E, M) ist es klar zu identifizieren. Der zytotoxische Effekt auf Makrophagen und HeLa-Zellen äußert sich in einer Abrundung der infizierten Zellen und Ablösung von der extrazellulären Matrix, die Struktur des Zytoskeletts wird zerstört. Die Aktinfilamente zerfallen und das Aktin erscheint in verstreuten Segmenten im Zytosol. Mit YopE infizierte Zellen zeigen nahezu den gleichen Effekt, da es aber in viel größeren Mengen sezerniert wird, scheint YopT vergleichsweise eine größere Zytotoxizität zu besitzen. In einem Versuch mit Mäusen konnte keine Verringerung der Kolonisierung der Peyerschen Platten nach Infektion mit einer YopT-Mutante im Vergleich zu Wildtyp und YopE-Mutante nachgewiesen werden (IRIARTE u. CORNELIS 1998).

ZUMBIHL et al. (1999) identifizierte die RhoGTPase RhoA als Substrat von YopT. RhoA wird in infizierten Endothelzellen biochemisch modifiziert und von seiner Lokalisation an der inneren Zellmembran entfernt. SHAO et al. (2002) konnten dann zeigen, dass es sich bei YopT um eine Cystein-Protease handelt, die die GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 *in vitro* und *in vivo* nahe ihres C-Terminus proteolytisch spaltet, woraufhin die membrangebundenen GTPasen in das Zytosol freigesetzt werden. Neuere Ergebnisse von ÄPFELBACHER et al. (2003) zeigen aber in einem Zellinfektionsmodell mit HUVEC, kultivierten humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen, dass bakteriell injiziertes YopT zur Zellmembran gelangt und nur die dort lokalisierte GTPase RhoA freisetzt. Diese akkumuliert im Zytosol und kann keine Signalfunktion mehr ausüben. Die Modifikation von 30-50 % des vorhandenen RhoA führt bereits zur Zerstörung der Aktin-Mikrofilamentbündel (stress fibers), wie in **Abbildung 4** zu sehen.

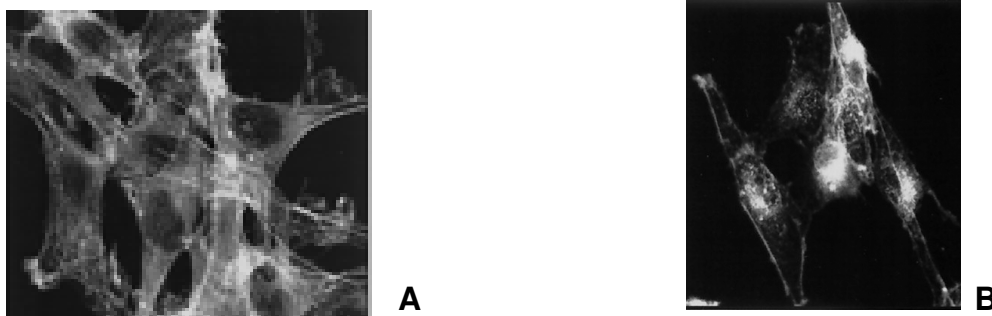


Abbildung 4. Zerstörung des Zytoskelettes durch YopT

(A) Nichtinfizierte Zelle, (B) mit einer Deletionsmutante Δ HOPEM+YopT infizierte Zelle. Die Aktinfilamente sind durch die Einwirkung von YopT nahezu zerstört. (GROSDENT et al. 2002)

2.7.2.5 YopP

YopP, bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* als YopJ bezeichnet, ist ein 32,5 kDa großes Protein. Es wird als “minor yop” betrachtet, da es, ähnlich wie YopT, nur in geringen Mengen sezerniert wird. YopP/J neutralisiert die pro-inflammatorische Reaktion verschiedener Zelltypen in vitro, indem es die Freisetzung des Tumor-Nekrose-Faktors α (TNF α) durch Makrophagen (BOLAND u. CORNELIS 1998) sowie die Freisetzung von Interleukin 8 (IL8) durch Epithelzellen (SCHESSER et al. 1998) und Endothelzellen (DENECKER et al. 2002) reduziert. Außerdem verringert YopP/J die Präsentation von Adhäsionsmolekülen wie z.B. interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1) und E-Selektin an der Oberfläche von Endothelzellen (DENECKER et al. 2002) und reduziert dadurch wahrscheinlich die Anziehung polymorpher Leukozyten an den Ort der Infektion. Die genannten Effekte beruhen alle auf einer Hemmung der Aktivierung von NF- κ B, einem Transkriptionsfaktor, dem eine Schlüsselrolle beim Einsetzen des Entzündungsgeschehens zukommt (BOLAND u. CORNELIS 1998, SCHESSER et al. 1998, RUCKDESCHEL et al. 1998). In erster Linie blockiert YopP/J die NF- κ B-Kinase β (IKK β , siehe **Abb. 5**), diese phosphoryliert I κ B, den Inhibitor von NF- κ B (ORTH et al. 1999). Durch das Verhindern dieser Phosphorylierung wird I κ B gleichzeitig vor einem Abbau geschützt, was wiederum die Translokation von NF- κ B zum Nukleus verhindert (CORNELIS 2002).

Zusätzlich zu diesem Eingriff in den NF- κ B Signalweg hemmt YopP/J die Aktivierung der MAPKs (mitogen activated protein kinases) namens JNK (c-jun-N-terminal kinase), p38 und ERK1 (extracellular signal-regulated kinase 1) sowie ERK2 (RUCKDESCHEL et al. 1997, PALMER et al. 1998). ORTH et al. (1999) fanden heraus, dass die Blockade der MAPKs bereits eine Stufe vorher über die Hemmung der MAPK-Kinasen (MKK) durch YopP/J reguliert wird (siehe **Abb. 5**). Die Inhibition des MAPK-Signalweges beeinträchtigt CREB (cAMP-response-element-binding protein), einen weiteren Transkriptionsfaktor, der an der Antikörperantwort beteiligt ist (MEIJER et al. 2000). SAUVONNET et al. (2002a) zeigten, dass YopP die Expression von insgesamt 37 Genen bei Makrophagen moduliert. Die meisten dieser Gene spielen eine Rolle bei der Antikörperantwort.

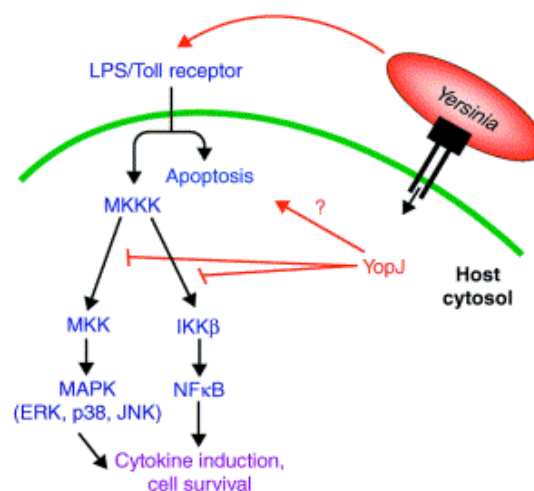


Abbildung 5. Angriffspunkte des Effektors YopP/J (ORTH 2002)

Eine weitere Fähigkeit von YopP ist die Induktion der Apoptose. Davon sind allerdings nur Makrophagen und keine anderen Zelltypen betroffen (MILLS et al. 1997, MONACK et al. 1997). Es ist bisher noch nicht geklärt, ob YopP/J diesen Zelltod über einen eigenen Signalweg mittels der Aktivierung von Procaspasen auslöst (DENECKER et al. 2001) oder ob die Apoptose vom Verlust des NF- κ B herrührt, das in seiner aktiven Form eine Schutzfunktion gegen apoptotische Signale durch Bakterien oder LPS ausübt (RUCKDESCHEL et al. 2001). Dass die YopP/J induzierte Apoptose auch in vivo eine Rolle bei der Etablierung einer systemischen Infektion spielt, konnten MONACK et al. (1998) durch Versuche mit Mäusen zeigen. Die orale LD₅₀ stieg bei einer YopJ-Mutante 64-fach an, wobei vor allem die Ausbreitung von den Peyerschen Platten zu mesenterialen Lymphknoten und Milz im Gegensatz zum Wildtyp vermindert war. Die Fähigkeit zur Invasion in tiefere Gewebe mit hoher Bakterienzahl korrelierte dabei mit dem Ausmaß YopJ induzierter Makrophagen-Apoptose.

2.7.2.6 YopM

YopM nimmt eine Art Sonderstatus ein, da seine Größe variiert und seine genaue Wirkung unbekannt ist. BOLAND et al. (1998) entdeckten, dass verschiedene Stämme von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* YopM in unterschiedlichen Größen von 41 kDa bis 55 kDa exprimieren, was aber deren Virulenz nicht verändert. Im Maus-Infektionsmodell ist die LD₅₀ von YopM-Deletionsmutanten stark erhöht, es handelt sich also um einen wichtigen Virulenzfaktor (MULDER et al. 1989, LEUNG et al. 1990). SKRZYPEK et al. (1998, 2003) zeigten, dass YopM vom Zytoplasma der infizierten Zelle über einen vesikulären Transportweg in den Zellkern gelangt, während SAUVONNET et al. (2002a) den Einfluss des Effektors auf die Expression verschiedener Gene, die in Makrophagen für Zellzyklus und Wachstum verantwortlich sind, beschreiben konnten. YopM besteht zum größten Teil aus sich wiederholenden Leucin-reichen Domänen (LEUNG u. STRALEY 1989), ein solches LRR- (leucine-rich repeat) Motiv ist unter signalgebenden Proteinen weit verbreitet und dient der Interaktion zwischen Proteinen (KOBE u. DEISENHOFER 1994). Eine Analyse der kristallinen Struktur von YopM ließ eine große Oberfläche für diese Protein-Protein-Interaktionen erkennen (EVDOKIMOV et al. 2001). MCDONALD et al. (2003) entdeckten, dass YopM in Säugetierzellen einen Komplex mit den Kinasen PRK2 (protein kinase C-like 2) und RSK1 (p90 ribosomal protein S6 kinase) bildet. Diese Kinasen sind über separate Signalwege mit jeweils unterschiedlichen Aktivatoren und Substraten in Zellproliferation, Translation und Apoptose involviert. Sie assoziieren nur in Anwesenheit von YopM und werden dadurch in einen aktiven Zustand versetzt. MCDONALD et al. (2003) nehmen an, dass diese Aktivierung durch YopM die Substratspezifität der Kinasen ändert und vielleicht neue Signalwege induziert.

2.7.2.7 LcrV

LcrV ist bereits seit den 50er Jahren bekannt, wo es von BURROWS u. BACON (1956) als protektives Antigen gegen die Pest beschrieben wurde.

Wie später noch beschrieben, ist LcrV neben YopB und YopD für die Translokation der Yops erforderlich. Daneben hat LcrV aber noch zahlreiche andere Eigenschaften, es wird daher als ein multifunktionelles Protein bezeichnet.

Eine weitere Funktion ist die Regulierung der Yop-Sekretion innerhalb des Bakteriums. Eine „inframe mutation“ ohne Veränderung des Leserasters in LcrV ergab eine Ca^{2+} -Unabhängigkeit sowie eine verminderte Transkription der Yop-Gene (BERGMAN et al. 1991, NILLES et al. 1997). Es wird außerdem vermutet, dass das im bakteriellen Zytoplasma lokalisierte Regulatorprotein LcrG den Sekretionsapparat von der zytoplasmatischen Seite her blockiert und dass die Bindung von LcrV an LcrG dieses Ventil öffnet, um volle Expression und Sekretion der Yops zu erreichen (NILLES et al. 1997).

Eine weitere Aufgabe ist die Modulation der Antikörperantwort des infizierten Wirtes. Die intravenöse Injektion eines LcrV-Fusionsproteins bei Mäusen führte zu einer Unterdrückung der Synthese von TNF- α und γ -Interferon (NAKAJIMA et al. 1995) sowie zu einer verstärkten Ausschüttung von Interleukin-10 in der Milz (NEDIALKOV et al. 1997). Diese immunsuppressive Wirkung konnte durch weitere Untersuchungen von SING et al. (2002) bestätigt werden, die mit dem Einsatz von rekombinantem LcrV eine verminderte TNF-Produktion in Makrophagen beobachten konnten. Ausgelöst wird dieser Effekt durch die LcrV-vermittelte Interleukin-10-Produktion. Die Relevanz dieser LcrV-vermittelten Immunsuppression für die Pathogenität von Yersinien wird durch eine experimentelle Infektion deutlich. Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen sind IL-10-defiziente Mäuse hochresistent gegen eine Infektion mit Yersinien (SING et al. 2002). Da bakteriell exprimiertes LcrV beim Kontakt mit HeLa-Zellen nicht nur einen Teil des Translokationsapparates bildet, sondern gleichzeitig in das umgebende Medium sezerniert wird (FIELDS u. STRALEY 1999, LEE et al. 2000), liegt die Vermutung nahe, dass freigesetztes LcrV auf diesem Weg seine immunsuppressive Wirkung auf die umgebenden Zellen entfalten kann (SING et al. 2002). FIELDS und STRALEY (1999) zeigten, dass auch LcrV in eukaryotische Zellen gelangt, allerdings auf einem anderen Weg als durch den bisher bekannten Ysc-Apparat. Sie beobachteten die Einschleusung von LcrV in HeLa-Zellen durch *Y. pestis* in Abwesenheit eines funktionellen Injektisoms oder anderen plasmidkodierten Proteinen.

2.7.3 Signale für Sekretion und Translokation

Bei einer Temperaturerhöhung auf 37 °C in einem Kulturmedium, dem die Ca^{2+} -Ionen entzogen wurden, stoppen Yersinien ihr Wachstum und starten stattdessen die Transkription und Ausschleusung der Yops in das umgebende Medium hinein (BRUBAKER 1983, MICHIELS u. CORNELIS 1988, STRALEY et al. 1993). Inkubiert man Yersinien zusammen mit eukaryotischen Zellen in einem

kalziumhaltigen Kulturmedium, werden die Yops trotzdem transkribiert und direkt in die Zielzellen injiziert, in vivo ist also der Kontakt zwischen Bakterium und eukaryotischer Zelle Teil des Auslösemechanismus (ROSQVIST et al. 1994, PETTERSSON et al. 1996, MOTA et al. 2005). Dieser Kontakt äußert sich in einem engen Anheften an die Zielzelle über spezielle Membranproteine, die Adhäsine. Bei Phagozyten wie Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten dagegen, kommt die Bindung über die Rezeptoren der Phagozyten zustande (BOYD et al. 2000a). Da Yersinien in nahezu jeden Zelltyp, an den sie binden können, Yops injizieren (BOYD et al. 2000a), stellt sich die Frage nach dem eigentlichen Sekretionssignal. CORNELIS (2002) vermutet, dass die Bindung an Membranlipide der eukaryotischen Zelle ausreichen könnte, um die Sekretion auszulösen und dass diese Bindung in vitro durch den Entzug von Ca^{2+} -Ionen imitiert wird.

Da die Kalziumkonzentration innerhalb einer Säugetierzelle ebenfalls sehr gering ist, diskutieren LEE et al. (2001), dass die extrazellulär bindenden Yersinien mittels Rezeptoren in der Lage sind, den Kalziumgehalt ihrer Umgebung zu messen. Die elektronenmikroskopisch dargestellten Nadeln könnten dabei neben dem Transport der Yops auch der Messung von Ca^{2+} -Ionen dienen.

Desweiteren existieren mit YopN (FORSBERG et al. 1991), TyeA (IRIARTE et al. 1998) und LcrG (SKRZYPEK u. STRALEY 1993) drei Proteine, die zumindest in vitro in die Kontrolle der Yop-Freisetzung involviert sind. Mutationen dieser Gene bewirken die Sekretion der Yops sowohl in kalziumreichem Medium als auch ohne vorhergehenden Zellkontakt. Offenbar wirken diese Proteine auf verschiedenen Ebenen als Verschlussventile für den Sekretionskanal (CORNELIS 1998). Ob diese drei Proteine auch als Rezeptoren bzw. Sensoren für das Erkennen eukaryotischer Zellen fungieren, ist unklar. YopN zum Beispiel wird bei 37 °C in einem kalziumhaltigen Medium, ähnlich also dem extrazellulären Raum in Säugetieren, an der Zelloberfläche der Bakterien exprimiert, während die übrigen Yops zurückgehalten werden (FORSBERG et al. 1991). MARENNE et al. (2003) nehmen an, dass YopN eine mögliche Lücke zwischen Injektisom und Pore überbrückt, ohne aber für Bildung und Stabilität der Nadel benötigt zu werden. Auch TyeA ist mit der Membran assoziiert und kann an YopN binden (IRIARTE et al. 1998), aber eine Interaktion mit Ca^{2+} -Ionen oder Wirtszellrezeptoren konnte bisher bei beiden Proteinen nicht nachgewiesen werden.

Der beschriebene Ysc-Apparat reicht zwar aus, um Yops in das umgebende Medium freizusetzen, aber die eigentliche Translokation der Effektoren durch die eukaryotische Zellmembran erfordert das Vorhandensein der Translokatorproteine YopB, YopD und LcrV, die ebenfalls sezerniert werden. Stämme, die Mutationen in einem dieser Gene tragen, sind nicht mehr in der Lage, Yops in die Zielzelle einzuschleusen (ROSQVIST et al. 1991, SORY u. CORNELIS 1994, HARTLAND et al. 1996, BOLAND et al. 1996, FIELDS et al. 1999, PETTERSSON et al. 1999). Stattdessen akkumulieren die Effektoren an der Kontaktzone zwischen Bakterium und Zielzelle (ROSQVIST et al. 1994, HAKANSSON et al. 1996).

YopB und YopD haben hydrophobe Domänen (HAKANSSON et al. 1993), so dass sie als Transmembranproteine angesehen werden, die mit der Membran der Zielzelle interagieren können.

HAKANSSON et al. (1996) beobachteten zuerst bei *Y. pseudotuberculosis* eine YopB-abhängige lytische Aktivität auf Schaf-Erythrozyten, sie vermuteten die Bildung einer Pore in der Membran der Erythrozyten. NEYT und CORNELIS (1999) konnten diese Ergebnisse auf *Y. enterocolitica* übertragen, sie untersuchten Makrophagenmembranen und fanden zusätzlich heraus, dass auch YopD für die Bildung der Pore nötig ist. Auch LcrV wird dafür unbedingt benötigt, besitzt aber ohne die Interaktion mit YopB und YopD alleine keine porenbildenden Eigenschaften (MARENNE et al. 2003). Stattdessen ist LcrV eher für die korrekte Zusammensetzung der durch YopB und D gebildeten Translokationspore erforderlich, wobei es eine elektronenmikroskopisch deutlich sichtbare Struktur an der Spitze der Nadel erzeugt (MUELLER et al. 2005). Anhand der Permeabilität zwei verschiedener Zucker wurde der innere Durchmesser der Pore auf 1,6 bis 2,3 nm geschätzt. Elektronenmikroskopisch konnte bisher niemand diese Poren darstellen, aber TARDY et al. (1999) erbrachten durch Versuche zur Leitfähigkeit einen elektrophysiologischen Beweis für die Insertion von Kanälen in künstliche Lipidmembranen, die mit YopB- und YopD- produzierenden Yersinien inkubiert wurden. Um diese Erkenntnisse mit den Bildern von HOICZYK und BLOBEL (2001) zu vereinbaren, schlägt CORNELIS (2002) ein Modell vor, in dem YopB, YopD und LcrV die Wirtszellmembran destabilisieren, bevor sie von der Nadel des Sekretionsapparates durchstoßen wird. Die zunehmende Adhäsion zwischen Bakterium und Wirtszelloberfläche soll der Nadel dabei den nötigen Druck verleihen. Alternativ dazu könnten die drei Translokatoren auch die ersten Proteine sein, die nach der Kontaktaufnahme über die Nadel sezerniert werden, um an deren Spitze die geöffnete Pore zur effizienten Translokation zu bilden.

Die Energie für den Sekretionsvorgang wird sehr wahrscheinlich durch das Protein YscN zur Verfügung gestellt, da es zur Familie der ATPasen gehört und Homologien zur F₀F₁-ATPase und anderen ATPasen zeigt. Mutationen in der katalytischen Domäne von YscN führten außerdem zu einem Verlust der Sekretionsfähigkeit (WOESTYN et al. 1994). Möglicherweise liefert aber auch ein Komplex von YscL, YscK, YscN und YscQ die nötige Energie, denn JACKSON und PLANO (2000) konnten mittels der Yeast-Two-Hybrid-Methode eine Bindung dieser Proteine untereinander nachweisen.

2.8 Yops als Grundlage moderner serologischer Diagnostik

Bereits ab der Mitte der Achtziger Jahre gelang es HEESEMANN et al. (1986, 1987), einen klassenspezifischen Immunoblot auf Basis der damals noch als „released proteins“ bezeichneten Yop-Antigene zu entwickeln. Die Vorteile des Immunoblots sind seine Genus-Spezifität und die Serotyp-Unabhängigkeit. Während die Yops eines Serotyps auch als Antigen für die Diagnose aller anderen *Yersinia*-Infektionen genutzt werden können, sind Kreuzreaktionen mit anderen Enterobakterien nicht bekannt (HEESEMANN et al. 1987, HOOBKAMP-KORSTANJE et al. 1988). Mittlerweile gilt der Immunoblot als sicherster diagnostischer Nachweis bei der humanen Yersiniose. Im direkten

Vergleich ist er dem Widal-Agglutinationstest sowohl bei Patienten mit Durchfall als auch bei postinfektiösen Folgeerkrankungen in Sensitivität und Spezifität überlegen, außerdem ist er einfach und schnell durchführbar (NEUBAUER et al. 2001).

Seit der Entwicklung des Immunoblots sind zahlreiche Patientenserum gerade im Hinblick auf die Diagnostik postinfektiöser Komplikationen untersucht worden. STAHLBERG et al. (1987) überprüften 32 Seren von 16 Yersiniose-Patienten zu Beginn und 12 Monate nach Beginn der Infektion, die Hälfte der Patienten litt an Reaktiver Arthritis. Grundsätzlich reagierten die verschiedenen Immunglobulinklassen mit den gleichen plasmidkodierten Molekülen, die Antikörperantwort der arthritischen Patienten fiel jedoch stärker aus.

HEESEMAN et al. untersuchten im gleichen Jahr 28 Seren von Enteritis-Patienten, im Vergleich zur Widal-Agglutination fiel der IgM- und IgA-Immunoblot gegen YopM, YopH, YopD und YopE wesentlich öfter positiv aus, die Stuhlkulturen waren stets positiv (O:3). Zudem wurden über 250 Seren von Patienten mit postinfektiösen Komplikationen untersucht, über 50 % der Seren zeigten im IgG-IgA Immunoblot eine positive Antikörperantwort. Dagegen waren sowohl Stuhlproben als auch Widal-Agglutination bei all diesen Patienten negativ.

Ein ähnliches Ergebnis stellten HOOBKAMP-KORSTANJE et al. (1988) vor. Sie fanden bei zehn Patienten mit erwiesener chronischer Yersinien-Infektion nach einem Jahr weder positive Stuhlkulturen noch agglutinierende Antikörper gegen O-Antigene. Nur mittels Immunoblot konnten IgA- und IgG-Antikörper gegen plasmidkodierte Antigene bei allen Patienten ermittelt werden. Bei einem Patienten war der zu Beginn der Infektion positive Agglutinationstiter bereits innerhalb von drei Monaten nicht mehr nachweisbar, während die begleitende Arthritis chronisch wurde.

STOLK-ENGELAAR und HOOBKAMP-KORSTANJE (1996) untersuchten 261 Patienten. Die Kultivierung alleine reichte zur Diagnose der unkomplizierten Yersinien-Enteritis während alle anderen Manifestationen nur mittels Anti-Yop-Blot ermittelt werden konnten.

Grundsätzlich ist aber keine homogene humorale Antikörperantwort gegen die einzelnen Yops garantiert, laut BÖLIN et al. (1985) sind von Fall zu Fall durchaus Unterschiede in der Erkennung der Yops zu beobachten. Dabei zeigt nicht jedes Serum im Immunoblot das gleiche Bandenmuster.

Der Verlauf der Antikörperantwort gegen Yops wurde ebenfalls untersucht. Über längere Zeit betrachtet, verschwinden bei unkomplizierten Krankheitsverläufen zuerst die IgM-Antikörper innerhalb von drei Monaten aus dem Blut, bald darauf auch die IgA-Antikörper. Nur die Immunglobuline der Klasse G können jahrelang persistieren (HOOBKAMP-KORSTANJE et al. 1988, CHATZIPANAGIOTOU et al. 1999). Im Allgemeinen wird das Vorhandensein von IgA und IgM als Zeichen einer frischen oder erst kürzlich überwundenen Infektion angesehen. In Fällen mit *Yersinia*-induzierten Folgeerkrankungen dagegen liegt sehr oft eine signifikante und lange anhaltende Erhöhung der IgA-Antwort vor, obwohl die Halbwertszeit dieses Immunglobulins nur ein paar Tage beträgt. HOOBKAMP-KORSTANJE et al. (1988) machten die diagnostisch wichtige Entdeckung, dass die Persistenz dieses Immunglobulins durch die chronische Stimulierung des intestinalen

lymphatischen Gewebes zustande kommt. Sie wiesen mittels Immunfluoreszenz und monospezifischen Antiseren im Biopsiematerial virulente und persistierende *Yersinia*-Antigene nach. Die Bakterien lagen tief in der Darmmukosa und im lymphatischen Gewebe der Submukosa, assoziiert mit Makrophagen.

Eine persistierende IgA-Antwort bestätigten auch HERRLINGER und ASMUSSEN (1992), die 22 Patientenserum zehn Jahre nach einer Yersiniose mit anschließender Reaktiver Arthritis überprüften und bei sechs Patienten im Immunoblot noch IgA- und IgG-Antikörper fanden. Bei weiteren fünf Patienten waren nur IgG-Antikörper detektierbar. Auch hier blieb der Widal-Agglutinationstest negativ.

Die bisherigen Studien der Serumverläufe bei infizierten bzw. immunisierten Tieren befassten sich vor allem mit Ratten und Kaninchen. HEESEMANN et al. (1987) infizierten Kaninchen mit *Y. enterocolitica* O:3 und beobachteten zehn Tage nach der Infektion IgA- und IgM-Reaktionen gegen Yops, gefolgt von IgG. Zwischen drei und sechs Monaten sanken IgA- und IgM-Antikörper stark ab, während IgG-Antikörper auch 15 Monate später noch im Serum vorlagen.

GAEDE et al. (1992) infizierten Arthritis-resistente und -empfindliche Ratten mit *Y. enterocolitica* O:8. Beide Rattenstämme serokonvertierten, aber die Arthritis-empfindlichen Ratten zeigten eine schnellere und stärkere Antikörperantwort in allen Immunglobulinklassen. Im Immunoblot war ersichtlich, dass sich beispielsweise die IgG-Antwort in der akuten Phase vor allem gegen YopH, YopD und LcrV richtete, gefolgt von Antikörpern gegen YopE und YadA. Besonders die Reaktion gegen YadA fiel im Gegensatz zu den resistenten Ratten viel stärker aus.

Auch bei der Diagnostik an Schafen war der Einsatz des Immunoblots erfolgreich, Lämmer mit durchweg subklinischer *Yersinia*-Infektion entwickelten eine starke Antikörperantwort gegen Yops (ROBINS-BROWNE et al. 1993).

Über Induktion und Verlauf der isotypspezifischen Antikörperantwort beim Reserviertier Schwein existieren dagegen nur fragmentarische Daten. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich daher auf die isotypspezifische systemische und lokale Antikörperantwort experimentell infizierter Schweine, um mit einer weiter entwickelten Immunoblottechnik Möglichkeiten der Erkennung infizierter Carrier-Tiere zu schaffen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Die Arbeit gliedert sich in zwei experimentelle Teile. Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene Yop-Effektorproteine und teilweise deren Translokatoren rekombinant in *E. coli* hergestellt. Ziel war hierbei die Herstellung hochgereinigter immunogener Proteine für die Entwicklung hoch sensativer und spezifischer serologischer Nachweissysteme zum Nachweis einer *Y. enterocolitica*-Infektion.

Neben der Auswahl geeigneter Primer zur Amplifizierung der verschiedenen Yop-Gene mittels PCR sowie der Auswahl geeigneter Expressionsvektoren und elektrokompenter Zellen, stand die Bestimmung optimaler Kultivierungs- und Expressionsbedingungen für die einzelnen Konstrukte im Mittelpunkt. Im Anschluss wurden verschiedene Verfahren zur Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine getestet und die optimalen Reinigungsbedingungen für die einzelnen Yops ermittelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden nunmehr mit den so gereinigten Effektorproteinen sowohl Hyperimmunseren in Kaninchen und Schweinen hergestellt, als auch eine Charakterisierung der Antikörperantwort bei experimentell mit *Y. enterocolitica* infizierten Schweinen durchgeführt. In einem orientierenden Vorversuch wurden dafür zunächst zwei Ferkel mit *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 infiziert und die verschiedenen Yops im Westernblot auf ihre Eignung als Antigene zur Detektion einer *Y. enterocolitica*-Infektion getestet. Der Nachweis Yop-spezifischer Antikörper erfolgte im Serum sowie in Synovia, Tränenflüssigkeit, Speichel und der Flüssigkeit verschiedener Darmabschnitte. In einem zweiten experimentellen Infektionsversuch mit neun Tieren wurde die isotypspezifische (IgA, IgM, IgG) Antikörperantwort der infizierten Tiere gegen die rekombinanten Proteine im Verlauf der Infektion untersucht. Insgesamt standen dabei 99 Serumproben, 18 Proben mit Tränenflüssigkeit, 18 Speichelproben, neun Proben mit Gelenksflüssigkeit sowie 36 Proben von der Oberfläche verschiedener Darmabschnitte zur Verfügung. Die gleiche Anzahl Proben wurde von einer zweiten Gruppe mit neun negativen Kontrolltieren gewonnen. Gleichzeitig erfolgte eine Prüfung der Verwendbarkeit des während dieser Arbeit hergestellten Testsystems für die Routinediagnostik in Praxis und Labor. Anschließend wurden dafür die rekombinanten Proteine mittels spezieller affinitätschromatographischer Methoden weiter aufgereinigt und mittels Sprühverfahren auf Blotstreifen aufgebracht. Mit den so hergestellten Teststreifen wurde die Auswertung der lokalen und systemischen Antikörperantwort von neun experimentell mit *Y. enterocolitica* infizierten Schweinen vorgenommen.

3.2 Material und Methoden, Teil 1: Herstellung der rekombinanten Antigene

3.2.1 Bakterienstämme

1. *Yersinia enterocolitica* ssp. *paleartica*, Stamm Y11, Bioserotyp 4/O:3 (DSMZ 13030)
2. *Yersinia pseudotuberculosis*, Stamm Y36 (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München)

Beide pathogene, plasmidtragende Stämme wurden für die PCR-Amplifikation der Yop-Gene, *Y. enterocolitica* außerdem für die experimentelle Infektion der Versuchstiere eingesetzt.

3.2.2 Nährmedien zur bakteriellen Anzucht

Für die Kultivierung der beiden plasmidliefernden *Yersinia*-Stämme wurde die nichtselektive Luria-Bertani-(LB)-Bouillon (Fa. Difco, Heidelberg) verwendet. Als festes Medium wurde Standard-Nähragar-I (Fa. Merck, Darmstadt) eingesetzt.

Das weitere Ausplattieren von Vorkulturen oder Einzelkolonien nach der Transformation erfolgte auf LB-Agar, dem das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml beigesetzt wurde, um das Wachstum plasmidhaltiger, ampicillinresistenter Klone zu favorisieren. Auch für die Kultivierung in flüssigem Medium wurde der LB-Bouillon ab diesem Zeitpunkt Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben.

Bei der Auswahl *Yersinia*-negativer Schweine zur Immunisierung wurde für die Untersuchung der Kotproben auf *Y. enterocolitica* als selektives Anreicherungsmedium Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat-(ITC)-Bouillon (Fa. Merck, Darmstadt) verwendet. Die anschließende Ausplattierung erfolgte auf dem Selektivnährboden Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-(CIN)-Agarmedium (Fa. Merck, Darmstadt).

3.2.3 Oligonukleotide

Die auf dem Plasmid von *Y. enterocolitica* lokalisierten Yop-Gene wurden jeweils durch ein spezifisches Oligonukleotidpaar (Primer) amplifiziert.

Für die Konstruktion der Primer wurde die bereits bekannte und in der NCBI-Datenbank verfügbare DNA-Sequenz des Plasmides pYVe227 (acc. No. NC 002120) von *Y. enterocolitica*, Stamm W22703, verwendet. Die endgültige Konstruktion unter Berücksichtigung geeigneter Restriktionsschnittstellen für die Klonierung der PCR-Produkte (siehe **Tab. 5**) erfolgte mit Hilfe des PC-Programmes „Genrunner“ (Fa. Hastings Software, USA). Die Primerpaare wurden jeweils an Anfang und Ende positioniert, um das komplette Gen zu amplifizieren.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma VBC-Genomics in Wien, Österreich, synthetisiert und sind in der nachfolgenden **Tabelle 5** aufgelistet.

Tabelle 5. Eingesetzte Oligonukleotidpaare für die Amplifikation der einzelnen Yop-Gene.

Die eingefügten Schnittstellen sind eingerahmt. Daten zu Sequenz und Produktlänge stammen aus der Gen-Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) sowie aus der Protein-Datenbank UniProt Knowledgebase vom „Swiss Institute of Bioinformatics (SIB).“

Zielgen	Bezeichnung der Oligonukleotide	Sequenz	Länge des Produktes
YadA	YadA-f	5'-ATAGGATCCAAATGACTAAAGATTTTAAGATC-3'	1364 bp
	YadA-r	5'-ATAAAGCTTTTACCACTCGATATTAAATG-3'	
YopB	YopB-fw	5'-AGCATGGATCCATGAGTGCGTTGATAACCC-3'	1205 bp
	YopB-rev	5'-GCCGAAGCTTTTAAACAGTATGGGGTCTGC-3'	
YopD	YopD-fw	5'-AGCATGGATCCATGACAATAAATATCAAGAC-3'	920 bp
	YopD-rev	5'-AGCATGGTACCTCAGACAACACCAAAAGCGGC-3'	
YopE	YopE2-f	5'-AGCATGGATCCATGAAAATATCATCATTTATTTTC-3'	659 bp
	YopE2-r	5'-GCCGAAGCTTTCACATCAATGACAGTAATTGC-3'	
YopH	YopH2-f	5'-AGCATGGATCCATGAACCTTATCATTAAAGCGATC-3'	1405 bp
	YopH2-r	5'-GCCGAAGCTTTAGCTATTTAATAATGGTC-3'	
LcrV	LcrV-fw	5'-AGCATGGATCCATGATTAGAGCCTACGAACAA-3'	974 bp
	LcrV-rev	5'-GCCGAAGCTTTACCTCGTGCATCTAGCAG-3'	
YopM	YopM-f	5'-AGCATGGATCCATGTTTATAAACCCAAGAAATG-3'	1103 bp
	YopM-r	5'-GCCGAAGCTTCTACTCAAATACATCATCTTC-3'	
YopN	YopN-f	5'-AGCATGGATCCATGACGACGCTTCATAACC-3'	881 bp
	YopN-r	5'-AGCATGGTACCTCAGAAAGGTGTAAGCCA-3'	
YopP	YopP-f	5'-AGCATGGTACCATGATTGGGCCAATATCAC-3'	866 bp
	YopP-r	5'-GCCGAAGCTTTTATACTTTGAGAAGTGTTT-3'	
YopT	YopT3-f	5'-AGCATGGATCCATGGACAGTATTCACGGACAC-3'	968 bp
	YopT3-r	5'-GCCGGGTACCTTAAACCTCCTTGGAGTCAA-3'	

3.2.4 Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen stammen von der Firma Fermentas, St. Leon-Rot: BamHI (5'...GGATCC...3'), HindIII (5'...AAGCTT...3'), KpnI (5'...GGTACC...3').

Bei der Konstruktion der Primer wurden die Restriktionsenzyme gemäß der Leserichtung der verwendeten Vektoren miteinander kombiniert (siehe **Tab. 6**).

Tabelle 6. Restriktionsenzyme für die Primerkonstrukte

Kombination	verwendet für folgende Yops:
5'...BamHI – Yop – HindIII...3'	YadA, YopB, YopE, YopH, LcrV, YopM
5'...BamHI – Yop – KpnI ...3'	YopD, YopN, YopT
5'...KpnI – Yop – HindIII...3'	YopP

3.2.5 Expressionsvektoren

In dieser Arbeit wurde der Vektor pQE 32 der Firma Qiagen, Hilden, sowie die Vektoren pRSET A und C der Firma Invitrogen, Karlsruhe, zur Klonierung der Fragmente genutzt.

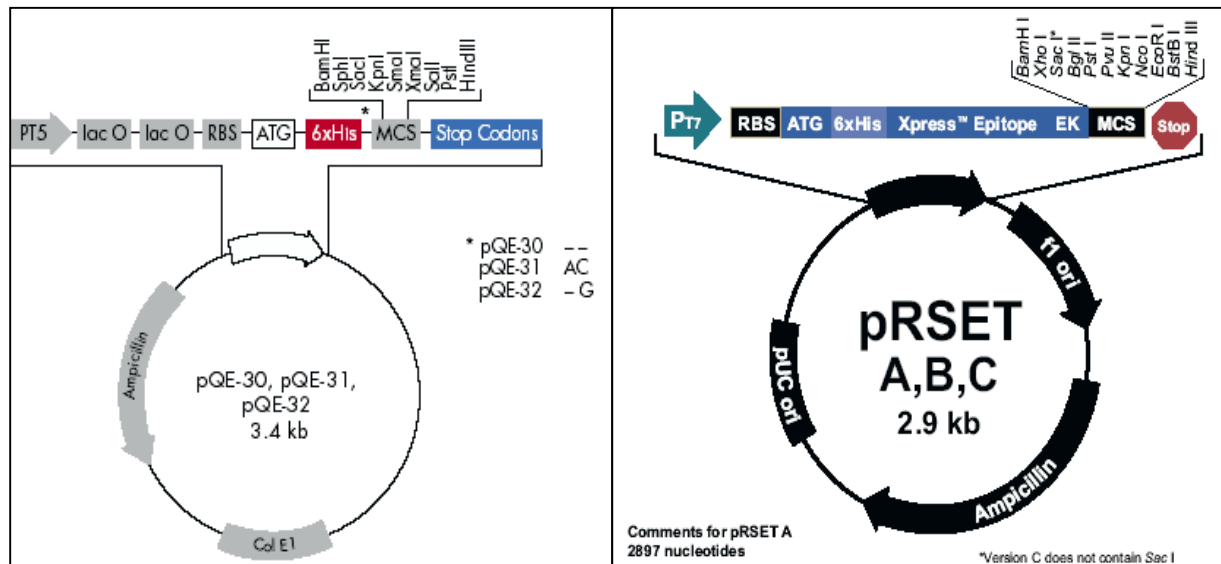


Abbildung 6. Verwendete Expressionsvektoren

3.2.6 Expressionsstämme

Zur Expression der klonierten PCR-Produkte wurde für den Vektor pQE32 der Stamm *E. coli* DH5 α (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und für pRSET A der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) sowie BL21 (DE3)pLysS (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) verwendet.

3.2.7 Bereits vorhandene exprimierende Klone

In einem dieser Arbeit vorausgegangenem Experiment konnte das *Yersinia*-Antigen YopO erfolgreich kloniert und zur Expression gebracht werden. Das YopO-Gen wurde dafür in den Vektor pQE32 eingefügt und in *E. coli* DH5 α transformiert.

3.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Ungeachtet der verschiedenen Serovare von *Y. enterocolitica* findet man beim Virulenzplasmid stets große Ähnlichkeit in der genetischen Organisation und größtenteils homologe DNA-Sequenzen.

letztmalig zugegebenen Chloroforms der Lösung hinzugefügt. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 26.000 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen. Das im Reaktionsgefäß verbliebene Pellet aus präzipitierter Plasmid-DNA wurde im Vakuum getrocknet (Typ „Univapo 100 H“, Fa. UniEquip, Martinsried) und für den weiteren Gebrauch in 30 µl H₂O_{bidest} resuspendiert.

Neben der isolierten Plasmid-DNA wurde zum Vergleich auch DNA aus einem Gesamtzelllysat von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* für die PCR aufgearbeitet. Hierfür wurden je 300 µl einer Übernachtskultur zentrifugiert (5 min, 13.000 x g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µl H₂O_{bidest} resuspendiert und aufgekocht (10 min). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 13.000 x g, 4 °C) enthielt der Überstand unter anderem chromosomale DNA und Plasmid-DNA.

3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Um nun Amplifikate der Yop-Gene zu erhalten, nutzt man die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR erlaubt es, beliebige DNA-Abschnitte, in diesem Fall die einzelnen auf dem Plasmid kodierten Yop-Gene, zu vermehren. Benötigt werden dazu zwei Oligonukleotide, die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren, ausreichende Mengen der vier Desoxynukleotide und eine hitzebeständige DNA-Polymerase. Das Prinzip der PCR beruht auf einer Zerlegung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge (Denaturierung) durch Erhitzen, Hybridisierung der Primer (Annealing), und von diesen ausgehend eine Neusynthese komplementärer DNA-Stränge (Extension). Dieser Zyklus wird 20-30 mal wiederholt.

3.2.9.1 PCR-Bedingungen

Für alle PCR-Reaktionen wurde ein Volumen von 100 µl je Ansatz in 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen (Fa. Peqlab, Erlangen) gewählt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist im Anhang beschrieben. Am Thermocycler „GeneAmp-2400“ (Fa. Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA) wurden die Zyklusbedingungen wie in **Tabelle 7** aufgeführt, gewählt:

Tabelle 7. PCR-Bedingungen für YadA und Yop-Gene

Gen	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen
<i>yadA</i>	60 sec, 94 °C	40 sec, 52 °C	80 sec, 72 °C	31
<i>yopE, yopH</i>	60 sec, 94 °C	40 sec, 56 °C	90 sec, 72 °C	30
<i>yopM, yopN, yopP, yopT</i>	60 sec, 94 °C	40 sec, 58 °C	60 sec, 72 °C	31
<i>yopB, yopD, lcrV</i>	60 sec, 94 °C	40 sec, 62 °C	90 sec, 72 °C	30

Die Annealing-Temperaturen für die Amplifikation wurden entsprechend des Guanin/Cytosin-Gehaltes der eingesetzten Primer gewählt. Bei jeder Amplifikation fand vor dem ersten Zyklus eine initiale Denaturierung für die Dauer von 5 min bei 94 °C statt, der letzte Zyklus endete mit einem 7 min umfassenden Extensionsschritt bei 72 °C.

3.2.10 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, welches die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld ausnutzt. Zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten werden meist elektrisch neutrale Gele aus Agarose verwendet, die aufgrund ihrer Porenstruktur wie Molekülsiebe wirken.

Der Nachweis der Amplifikate erfolgte somit durch Elektrophorese in einem 1 %igen (w/vol) Agarosegel. Dazu wurden 4 g Agarose (Fa. Life Technologies, Paisley, Schottland) mit 400 ml TBE-Puffer gemischt, im Mikrowellenherd verflüssigt und 50 ml dieser Flüssigkeit nach kurzem Abkühlen in die vorbereitete Gelkammer (Fa. Bio-Rad, München) eingefüllt. Nach der Verfestigung des Agarosegels wurde die Kammer mit TBE-Puffer befüllt, bis das Gel bedeckt war. Daraufhin wurden jeweils 7 µl der PCR-Proben mit 2 µl DNA-Auftragspuffer (Fa. Peqlab, Erlangen) vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert, zum Größenvergleich wurden zusätzlich 3 µl DNA-Marker λBSTE (Fa. New England Biolabs, Frankfurt) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 150 V innerhalb von 30 min. Zur Sichtbarmachung der DNA-Moleküle verblieb das Gel für 20 min im Ethidiumbromid-Bad, bestehend aus 0,5 µg Ethidiumbromid (Fa. Amresco, Solon, USA) pro ml H₂O_{bidest.} Nach einem 10minütigen Wässern ließen sich die fluoreszierenden Banden per UV-Licht im Geldokumentationssystem „Gel Doc 2000“ (Fa. Bio-Rad, München) detektieren.

Zur weiteren Verwendung wurden die PCR-Produkte mittels eines PCR-Purification-Kits (Fa. Quiagen, Hilden) gereinigt. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller im Protokoll angegeben (QIAquick Spin Handbook, 03/2001, Seite 18).

3.2.11 Restriktion und Ligation

DNA-Fragmente oder auch komplette Gene lassen sich in spezielle Plasmide, den sogenannten Vektoren einbauen. Diese Vektoren können dann in Bakterien transformiert und in diesen vermehrt werden. Wichtiger Bestandteil eines Klonierungsvektors ist ein Replikationsstartpunkt (Origin), der in der verwendeten Wirtszelle aktiv ist, sowie ein Markergen zur Selektion positiver Klone, üblicherweise eine Antibiotikaresistenz. In dieser Arbeit wurde der Vektor pQE 32 der Firma Qiagen, Hilden, sowie die Vektoren pRSETA- und C der Firma Invitrogen, Karlsruhe, genutzt. Beide Vektoren verfügen 5'-seitig des zu klonierenden PCR-Produktes über eine zusätzliche Nukleinsäuresequenz, welche für sechs aufeinanderfolgende Histidinmoleküle kodiert. Bei der Expression entsteht dadurch ein N-terminales Fusionsprotein, bei dem sechs Histidinmoleküle N-terminal angehängt sind, der

sogenannte His-Tag. Der His-Tag erlaubt die Reinigung der exprimierten rekombinanten Proteine über eine Affinitätschromatographie mittels Ni-NT-Agarose (siehe **Punkt 3.2.17.1**)

Um die Yop-PCR-Produkte in einen solchen Vektor einzufügen, müssen Fragment und Vektor vorher mit Restriktionsenzymen gespalten werden. Diese Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die definierte, palindromische Basensequenzen in einer doppelsträngigen DNA erkennen und spalten, so dass spezifische Fragmente mit komplementären überhängenden Enden entstehen. Die amplifizierten Yop-PCR-Produkte enthielten am 5'-Ende und am 3'-Ende solche Spalt- oder Schnittstellen, um sie in einen gleichermaßen geschnittenen Expressionsvektor einfügen zu können. Ein Teil der Moleküle wird dabei so hybridisiert, dass das Fragment in die Vektor-DNA integriert wird. Die Spaltstellen werden durch eine DNA-Ligase geschlossen, so dass ein neukombiniertes (rekombinantes) Plasmid vorliegt.

Für die Restriktionsansätze mit den in **Tabelle 4** aufgeführten Enzymen wurde pro 100 µl Ansatz je 10 µl des 10 x Inkubationspuffers Y⁺/Tango (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mit 4 µl der entsprechenden Enzymkombination (z.B. 2 µl BamHI und 2 µl HindIII) sowie 5 µl amplifiziertes Yop-Gen eingesetzt. Zur Vervollständigung des Ansatzes wurde H₂O_{bidest} ad 100 µl dazu gegeben.

Die Restriktionsansätze für die Expressionsvektoren wurden nach gleichem Schema pipettiert, allerdings mit 20 µl Vektor-DNA und entsprechend weniger H₂O_{bidest}.

Die Inkubation aller Ansätze erfolgte bei 37 °C für 2 h. Nach kurzem Abkühlen schloss sich eine Reinigung und Aufkonzentrierung mit dem bereits erwähnten PCR-Purification-Kit an.

Die nachfolgende Ligation der linearen DNA-Moleküle erforderte eine T4 DNA-Ligase zur Verknüpfung der kompatiblen überhängenden Enden. Nachdem Vektor und Insert im Verhältnis 1:1 mit H₂O_{bidest} ad 18 µl vermischt wurden, fand eine fünfminütige Inkubation bei 50 °C statt, um ein vorzeitiges Aneinanderlegen der Enden zu verhindern. Erst danach wurden 2 µl 10 x Ligasepuffer und 0,5 µl T4 DNA-Ligase (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) dem Ansatz beigegeben. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h wurde der Ligationsansatz für 10 min auf 65 °C erhitzt, um die Ligase zu deaktivieren.

3.2.12 Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation

Als geeignete Empfängerbakterien, die ein Plasmid aufnehmen und neben dem eigenen Genom replizieren können, haben sich verschiedene Laborstämme von *E. coli* etabliert. Unter **Punkt 3.2.6** sind die in dieser Arbeit verwendeten Stämme aufgeführt. Eine weitverbreitete Methode um die zirkuläre Plasmid-DNA in die Wirtszellen zu transferieren, ist die Elektroporation. Hier wird die Bakteriensuspension kurzzeitig einem starken elektrischen Impuls ausgesetzt, der wahrscheinlich eine Porenbildung in der Zellwand bewirkt, durch die das Plasmid dann in das Zellinnere gelangt.

Um die Transformation zu ermöglichen, müssen die Empfängerbakterien vorbehandelt, d.h. elektrokompent gemacht werden. Dafür wurden 120 ml LB-Medium mit 2,4 ml (2 %) einer

Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bis zu einer OD von 0,6 bei 37 °C aerob inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Spektrum-Photometer (Typ „Lambda Bio“, Fa. Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA). Nach dem Zentrifugieren (10 min, 1.500 x g, 4 °C) im vorgekühlten Rotor wurden die Bakterien auf Eis gestellt und mit einer ausreichenden Menge eiskalten, sterilen 10 %igen Glycerins resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, bevor die Zellen dann endgültig in ca. 2 ml 10 %igem Glycerin aufgenommen und in 240 µl Aliquots bei –70 °C gelagert wurden.

Für die Transformation wurden 3 µl eines jeden Ligationsansatzes mit jeweils 80 µl langsam aufgetauter kompetenter Zellen vermischt und in Elektroporationsküvetten (Fa. Peqlab, Erlangen) eingefüllt. Die Transformation wurde mit dem Elektroporationsgerät (Typ „Easyject Prima“, Fa. Peqlab) mit 2500 Volt nach Betriebsanleitung durchgeführt. Unmittelbar danach mussten die Zellen in je 600 µl LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C aerob inkubiert werden. Im Anschluss daran erfolgte ein Ausstrich auf ampicillinhaltigen Nährböden (100 µg Ampicillin pro ml LB-Agarmediumplatte), da sich so nur die Zellen vermehren, die das Plasmid und damit auch die übertragene Antibiotika-Resistenz aufgenommen haben.

3.2.13 Kultivierung und Induktion

Die nach der Transformation vorhandenen Einzelkolonien wurden mit einer Pipettenspitze abgenommen und einzeln über Nacht in 5 ml LB-Amp-Medium bei 37 °C aerob kultiviert. Um die Klone zu finden, die tatsächlich das gewünschte Insert tragen, wurde eine Plasmidisolierung wie unter **Punkt 3.2.8** beschrieben, durchgeführt, jedoch ohne die zeitintensive Phenol-/Chloroformextraktion. Plasmidtragende Klone konnten mit der Agarosegelelektrophorese aufgrund des Größenunterschiedes ihrer DNA im Vergleich zum reinen Vektor ohne Insert detektiert werden.

Ein Aliquot von 400 µl einer Übernachtskultur dieser positiven Klone wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (10 min, 6.000 x g, 4 °C) und für eine Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) vorbereitet. Weitere 100 µl wurden in 5 ml LB-Amp-Medium überimpft und bis zu einer OD von 0,6 im Schüttler (Fa. Braun Biotech, Melsungen) bei 120 rpm und 37 °C inkubiert.

Die verwendeten Expressionsstämme *E. coli* BL21 (DE3) und BL21(DE3) pLysS verfügen auf ihrem Chromosom über ein Gen für die T7-RNA-Polymerase während das klonierte Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors steht. Um während der exponentiellen Phase eine für die Zelle zu frühe und eventuell toxische Expression des klonierten Gens zu vermeiden, befindet sich die Polymerase unter der Kontrolle des Promotors P_{lac} , der durch IPTG (Fa. AppliChem, Darmstadt) induzierbar ist. IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) ist ein künstlicher Induktor des Laktose-Operons bei *E. coli*. Im Gegensatz zur Laktose wird IPTG nicht im natürlichen Metabolismus von Bakterien umgesetzt, die Konzentration bleibt konstant und das Gen bleibt aktiv. Den Kulturen wurde demnach IPTG in

Konzentrationen von 0,5 bis 3 mmol/ml zugesetzt um die optimale Konzentration für eine gute Expression des gewünschten Yop-Proteins zu ermitteln. Vom Zeitpunkt der Induktion ausgehend, erfolgte nach 1 h, 2 h, 4 h und 14-16 h eine Entnahme von 400 bis 800 µl der jeweiligen Flüssigkulturen, um so den Zeitraum der höchsten Proteinexpression bestimmen zu können.

3.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) bindet an Proteine proportional zu ihrer molaren Masse und bewirkt eine Entfaltung und Denaturierung. Im elektrischen Feld wandern die vom negativ geladenen SDS umgebenen Proteine Richtung Anode, wobei sich die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht auftrennen.

In dieser Arbeit sollte durch SDS-PAGE vor allem ermittelt werden, ob die Yops, verglichen mit dem *E.coli* Kontrollstamm ohne Insert, überhaupt exprimiert werden und ob die Höhe der Bande im Gel auch mit dem bekannten Molekulargewicht der Proteine übereinstimmt.

Die Gelelektrophorese wurde mit einer Mini-Protean[®]-Elektrophoreseapparatur am Netzgerät Powerpac 200[®] (Fa. Bio-Rad, München) durchgeführt. Nach Vorbereitung der Glasplatten wurden Trenngel (12 %ig) und Sammelgel (4 %ig) wie im Anhang beschrieben hergestellt. Man gießt zuerst das noch flüssige Trenngel und dann das ebenfalls flüssige Sammelgel zwischen zwei Glasplatten, wo sie polymerisieren. Dabei sorgt ein in das Sammelgel gesteckter Kamm für die jeweils gewünschte Zahl an Auftragstaschen. Anschließend werden die Gele in die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingebaut.

Die Pellets aus Übernachtskulturen und unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten ab Induktion wurden mit SDS-Probenpuffer nach Lämmli resuspendiert und 5 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (Fa. Biozym, Oldendorf) wurden die Proben einzeln in die dafür vorgesehenen Taschen des Sammelgels gefüllt. Die chemische Zusammensetzung der verwendeten Gele und Puffer ist im Anhang dieser Arbeit aufgelistet.

Nach dem Anlegen einer konstanten Spannung von 200 V betrug die Laufzeit der Elektrophorese etwa 45 min. Anschließend erfolgte der Ausbau des Gels aus der Elektrophorese-Apparatur und die Überführung in die Protein-Färbelösung.

3.2.15 Färbung der Polyacrylamid-Gele

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurde eine Färbung mit Coomassie[®]-Brillantblau (Fa. Serva, Heidelberg) vorgenommen. Hierfür wurde das zu färbende Gel nach der Elektrophorese in einer Schale mit Färbelösung für 20 min auf einer Wippe geschwenkt. Anschließend wurde das Gel wiederholt in frischer Coomassie-Entfärbelösung geschwenkt, um ungebundene Farbpigmente zu entfernen. Die Proteinbestandteile der aufgetragenen Proben waren nun als dunkelblaue Banden zu erkennen.

3.2.16 Immunoblot

Der Immunoblot erlaubt die Detektion von Proteinen, die spezifisch mit einem Antikörper reagieren. Ließen sich die Proteinbanden im SDS-PAGE nicht eindeutig zuordnen oder schien die Expression zu schwach, diente diese Methode zur besseren Identifizierung der Proteinexpression positiver Klone.

Nach Auftrennung der jeweiligen Antigenpräparation in der SDS-Gelelektrophorese erfolgte der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Roti[®]-PVDF, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) mit einer Porengröße von 45 µm. Der Transfer fand in einer Blottingapparatur (Typ „TransBlot-Semidry[®]“, Fa. Bio-Rad, München) unter Anwendung des halbtrockenen Verfahrens, bei welchem nur die Filterpapiere mit Transferpuffer getränkt werden, in 30 min bei 10 Volt statt.

Die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran erfolgte mit einem Blocking-Puffer (Roti-Block[®], Fa. Carl Roth, Karlsruhe) für 2 h bei 37° C in einem Hybridisierungssofen (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) oder wahlweise über Nacht bei Raumtemperatur. Die Membran wurde kurz in PBS-Tween (0,1 %ig) gewaschen, dann folgte eine Inkubation für 1 h in einem mit PBS-T auf 1:100 verdünnten Schweine- oder Kaninchenserum, welches spezifische Antikörper gegen Yops enthielt (s. **Punkt 3.4.1**). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für jeweils 10 min wurde die Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert, dabei handelte es sich um Meerrettichperoxidase-konjugiertes, affinitätschromatographisch gereinigtes Ziege-Anti-Schwein-IgG oder Ziege-Anti-Kaninchen-IgG in einer Gebrauchsverdünnung von 1:1000. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte nach einem erneuten dreifachen Waschschrift mittels einer hergestellten Lösung aus 4-Chlor-1-naphtol und 30 %igem H₂O₂. Dafür wurden 18 µl des H₂O₂ in 20 ml PBS pipettiert und anschließend 4 ml des Chloronaphtols (3 mg/ml, gelöst in Methanol) dazugegeben. Der Blot wurde in der Lösung geschwenkt, bis die Banden deutlich sichtbar waren, danach wurde die Reaktion mit H₂O abgestoppt.

3.2.17 Proteinreinigung

Die weitere Verwendung der exprimierten Yop-Antigene als Grundlage einer serologischen Diagnostik bzw. als Antigene für die Immunisierung von Kaninchen und Schweinen setzte eine Aufreinigung der Proteine voraus. Dabei mussten vor allem verunreinigende Proteine des *E. coli*-Wirtsstammes entfernt werden. Während dieser Arbeit wurden daher verschiedene Reinigungsmethoden geprüft und verglichen.

3.2.17.1 Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie wird die Bindungsfähigkeit von Proteinen an bestimmte chemische Gruppen genutzt. Weit verbreitet ist dabei das Nickel-Chelat-System, wo ein Chelator im Komplex mit einem Nickel (II)-Ion vorliegt und die Histidinmoleküle des Yop/His-Tag-Fusionsproteins an

dieser Matrix gebunden werden. Andere ungebundene Proteine werden durch Waschschr tte entfernt, während das zu reinigende Protein durch Puffer mit niedrigen pH-Werten oder durch Verdrängung mit dem höher affinen Imidazol eluiert wird.

a) Nickel-NTA-Agarose

Die Bakterienkulturen der Expressionsstämme mit den verschiedenen Klonen wurden zentrifugiert (10 min, 2.000 x g, 4  C) und das entstandene Pellet mit denaturierendem Puffer B (pH 8) durch 30min tiges Schwenken auf einer Wippe lysiert (alle verwendeten Puffer sind im Anhang aufgeführt). Nach Zugabe von 500 bis 1000 Öl einer Nickel-NTA-Agarose-Suspension (Fa. Quiagen, Hilden) mit Nitriloessigs ure als Chelator wurde das Gemisch für weitere 30 min geschwenkt, bevor es in eine 20 ml Spritze mit eingelegtem Filterpapier zum Rückhalt der z hfl ssigeren Agarose umgef llt wurde. Durch Druck auf den Kolben bzw. bei größeren Volumina mit Hilfe einer Druckluftpumpe wurde der Durchlauf entfernt. Die in der Spritze aufgefangene Nickel-NTA-Agarose wurde mit 20 ml Puffer B durchgemischt und die Flüssigkeit erneut durch die Spritze gepresst. Dieser Waschschr tt wurde mit 10 ml Puffer C (pH 6,3) wiederholt. Danach folgte die Elution des gereinigten Proteins von der Matrix durch Zugabe von 3 x 0,5 ml Puffer D (pH 5,9) und 10 x 0,5 ml Puffer E (pH 4,5). Von den Waschfraktionen und den Eluat n wurden je 18 Öl mit 5 Öl Lämmli-Probenpuffer gemischt und auf einem Proteingel analysiert.

b) Ni-NTA Spin-Kit

Bei kleineren Kulturvolumina oder geringer Expression ließ sich der Ni-NTA Spin Kit (Fa. Quiagen, Hilden) anwenden. Das Prinzip bleibt gleich, allerdings ist das Ni-NTA mit Silica in einer Säule, der so genannten „spin column“, fest installiert. Die Reinigung wurde nach der Vorschrift des Quiagen Ni-NTA Spin Handbook von Januar 2000 ausgeführt. Auch hier wurden Puffer B bis E mit absteigenden pH-Werten von 8,0 bis 4,5 eingesetzt, die durch Zentrifugation die Säule durchqueren und dabei die an der Matrix gebundenen Yops reinigen und letztendlich eluieren.

c) HisTrap Kit

Der HisTrap Kit (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) stellte eine weitere Möglichkeit der Proteinaufreinigung dar. So genannte 1 ml Chelating Sepharose High Performance-Säulen mit Iminodiessigsäure als Chelator werden mit einem Metall-Ion beladen, welches die bereits erwähnte Bindung mit den anhängenden Histidinmolek len der Yops eingeht. Als Metall-Ion wurde in dieser Arbeit 0,1 M NiSO  verwendet.

Die zentrifugierten Kulturen lysierten 1 h mit einem denaturierenden Puffer, der 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinhydrochlorid enthält. Währenddessen wurde die Säule laut Protokoll „instructions HisTrap Kit“ per Hand über eine mitgelieferte Spritze mit Nickel-Ionen beladen und mit 10 ml Lysepuffer äquilibriert. Anschließend erfolgte die Applikation des Lysates. Ein Volumen von 10 ml eines Waschpuffers mit einer Imidazolkonzentration zwischen 40 und 60 mmol entfernte störende

E. coli-Proteine, bevor dann das jeweilige Yop mit einem stark imidazolhaltigen (bis 500 mmol) Puffer in 5 x 1 ml Aliquots von der Säule eluiert wurde. Die Aliquots, der Lysatdurchlauf und die Waschfraktion wurden dann mittels Coomassie-Proteingel analysiert.

d) Chromatographie-System ÄKTApurifier

In Zusammenarbeit mit der Firma Labor Diagnostik GmbH Leipzig wurde die Reinigung des Lysates mit dem Chromatographie-System „ÄKTApurifier 10“ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) getestet. Das Chromatographiegerät wurde für diesen Zweck mit 5 ml HisTrap-Säulen bestückt. Der ÄKTApurifier 10 arbeitet vollautomatisch und führt Äquilibration, Waschschrte und Elution der Proteine mit den denaturierenden Puffern (siehe Anhang) durch. Das Prinzip der Reinigung über Bindung der Histidinmoleküle an Nickel-Ionen und Verdrängung mit Imidazol ist das Gleiche wie bei der manuellen Handhabung der Säulen. Die im Fraktionssammler in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangenen jeweiligen Eluate der acht Yops wurden im Western Blot mittels *E. coli*-Antikörper auf noch vorhandene *E. coli*-Proteine untersucht. Eventuell noch verunreinigte Eluate wurden dann erneut am ÄKTApurifier mittels einer *E. coli*-Affinitätsmatrix gereinigt. Für diesen zweiten Reinigungsschritt wurden die Eluate zuvor gegen 0,1 M TrisHCL-Puffer (pH 8) dialysiert, um die empfindlichen Antikörper auf der Matrix zu schonen. Eventuell präzipitierte Proteine wurden durch die Zugabe von NaOH gelöst, anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M TrisHCL (pH 8) auf pH 9 gesenkt und die Reinigung durchgeführt. Zum Abschluss der Reinigung erfolgte eine Bestimmung der Proteingehalts nach Bradford (M.M. Bradford, 1976) mit einer vorgefertigten Reagenz (Fa. Sigma, Deisenhofen) nach Anleitung des Herstellers.

3.2.17.2 Elektroelution

Die Elution von Proteinbanden aus einem präparativen Gel durch Anlegen einer elektrischen Spannung wurde mit dem „Mini Whole Gel Eluter“ in Kombination mit dem Netzgerät PowerPac 300 (beide Geräte von Fa. Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Proteinbande bewegt sich elektrophoretisch durch das Gel und wird automatisch in flüssigen Fraktionen gesammelt.

Für diese Methode wurde ein präparatives Polyacrylamid-Gel aus 4 %igem Sammel- und 12 %igem Trenngel hergestellt. Um größere Mengen an Proteinen auftragen zu können, wurde das Gel durch einen entsprechenden Kamm bei der Polymerisation mit nur einer großen Tasche versehen und die Gelelektrophorese durchgeführt. Das Gel wurde auf die Größe der Elutionskammer zurecht geschnitten und im Elutionspuffer äquilibriert. Die Kammer mit der unteren Elektrode wurde laut Vorschrift des Herstellers zusammengebaut und mit Elutionspuffer gefüllt, bevor das Gel so in die Kammer gelegt wurde, dass die vorher markierte Bande über einem der Elutionskanäle zu liegen kommt. Nach Befestigung der oberen Elektrode wurde für 20 min eine Spannung von 40 Volt angelegt. Danach erfolgte das automatische Absaugen der Flüssigkeit im Elutionskanal über einen mitgelieferten Fraktionssammler, der an eine Vakuumpumpe gekoppelt wurde.

Stark vereinfacht konnte das Prinzip auch in der vorhandenen Apparatur für die Agarosegelelektrophorese angewandt werden. Ein schmaler Streifen des präparativen Proteingels wurde gefärbt um die Position der Bande auf dem übrigen ungefärbten Gel bestimmen zu können. Danach wurde ein schmaler Streifen des Gels auf Höhe der angefärbten Bande mit einem Skalpell der Länge nach herausgeschnitten und in einen mit 1 – 2 ml TBE-Puffer gefüllten Dialyseschlauch (Typ Zellu-Trans, Fa. Roth, Karlsruhe) gelegt. Der Dialyseschlauch wurde in der Elektrophoresekammer zwischen den Elektroden platziert, die Elution des Proteins vom Gel in den TBE-Puffer fand bei 150 Volt statt.

3.3 Von der PCR zum gereinigten Protein: Zusammenfassung der Methoden zur Herstellung und Reinigung der rekombinanten Antigene

Zur Herstellung der rekombinanten Proteine in *E. coli* wurden zunächst die entsprechenden Yop-Gensequenzen mittels PCR amplifiziert. Als Template für die PCR-Reaktionen diente dabei gereinigte Plasmid DNA aus *Y. enterocolitica* Y11. Bei den so erhaltenen Amplifikaten waren keine Nebenprodukte ersichtlich, so dass die Yop-Gene für die weiteren Klonierungsschritte nach ihrer Aufreinigung direkt eingesetzt werden konnten. Das *yadA*-Gen wurde zusätzlich mit Template-DNA von *Y. pseudotuberculosis* amplifiziert. Da das *yadA*-Gen bei *Y. enterocolitica* um ca. 50 bp länger ist als bei *Y. pseudotuberculosis*, zeigten sich dementsprechend zwei unterschiedlich große Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Im weiteren Verlauf wurden die PCR Produkte gereinigt und mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und abermals gereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation der PCR-Produkte in die ebenfalls geschnittenen Vektoren und die Transformation mittels Elektroporation in *E. coli*.

Für dieses erste Ziel, nämlich die Herstellung eines Insert-tragenden Klons, der das gewünschte Yop-Protein exprimiert, wurden verschiedene Vektor/Wirtszellkombinationen geprüft. Zum Einsatz kam schließlich das Vektorsystem pRSET (Invitrogen) mit *E. coli* BL21(DE3) als elektrokompente Zellen für die YadA-Klonierung, sowie dem Stamm BL21(DE3)pLysS für alle anderen Yops.

Es konnten so für jedes Yop stets mehrere exprimierende Klone hergestellt werden, die als Microbank-Kultur langfristig bei –80 ° C aufbewahrt und bei Bedarf auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen werden konnten.

Um ausreichende Mengen an Protein herstellen zu können und dadurch auch die spätere Aufreinigung zu erleichtern, wurde eine Optimierung der Kultivierungs- und Induktionsbedingungen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Parameter wie Inkubationstemperatur, Schüttelgeschwindigkeit, optische Zelldichte bei Induktion, Konzentration des IPTGs und Dauer der Kultivierung nach Induktion untersucht. Die folgende **Tabelle 8** gibt einen Überblick über die vorhandenen Klone und die wichtigsten Expressionsbedingungen:

Tabelle 8: Optimierte Expressionsbedingungen der einzelnen Yops

Klon	Vektor/Wirtszelle	Kultivierung	Induktion
YadA	pRSET C / DE3	LB-Amp-Platten, 37 °C, über Nacht, Platten zur Proteingewinnung abschwemmen	IPTG nicht nötig
YopO	pQE32 / DH5 α	LB-Amp-Flüssigkultur, 37 °C	2 mM IPTG, ü.N.
YopH	pRSET A / DE3pLysS	LB-Amp-Flüssigkultur, 37 °C	1 mM IPTG, 2-4 h
YopM	pRSET A / DE3pLysS	LB-Amp-Flüssigkultur, 37 °C	1 mM IPTG, 4 h
LcrV	pRSET A / DE3pLysS	LB-Amp-Flüssigkultur, 37 °C	2 mM IPTG, 2 h
YopT	pRSET A / DE3pLysS	LB-Amp-Flüssigkultur, 37 °C	2 mM IPTG, ü.N.
YopD	pRSET A / DE3pLysS	LB-Amp-Flüssigkultur, 37 °C	2 mM IPTG, 1 h
YopN	pRSET A / DE3pLysS	LB-Amp-Flüssigkultur, 37 °C	1 mM IPTG, 4 h
YopP	pRSET A / DE3pLysS	LB-Amp-Flüssigkultur, 37 °C	1 mM IPTG, ü.N.
YopE	pRSET A / DE3pLysS	LB-Amp-Flüssigkultur, 37 °C	1 mM IPTG, 2 h

Für die Aufreinigung der exprimierten Proteine kamen verschiedene Reinigungssysteme zur Anwendung. Dabei erwies sich der HisTrap-Kit (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) schon unter Basisbedingungen als geeignet. Für jedes Yop wurde nun eine Optimierung der Reinigung durchgeführt. Ziel war es, die maximale Konzentration an Imidazol im Waschpuffer zu ermitteln, bei der noch keine Elution des jeweiligen Yops erfolgte, aber möglichst viel an ungebundenem Fremdprotein entfernt werden konnte. Die Optimierung ist beispielhaft für YopN in **Abbildung 8** zu sehen.

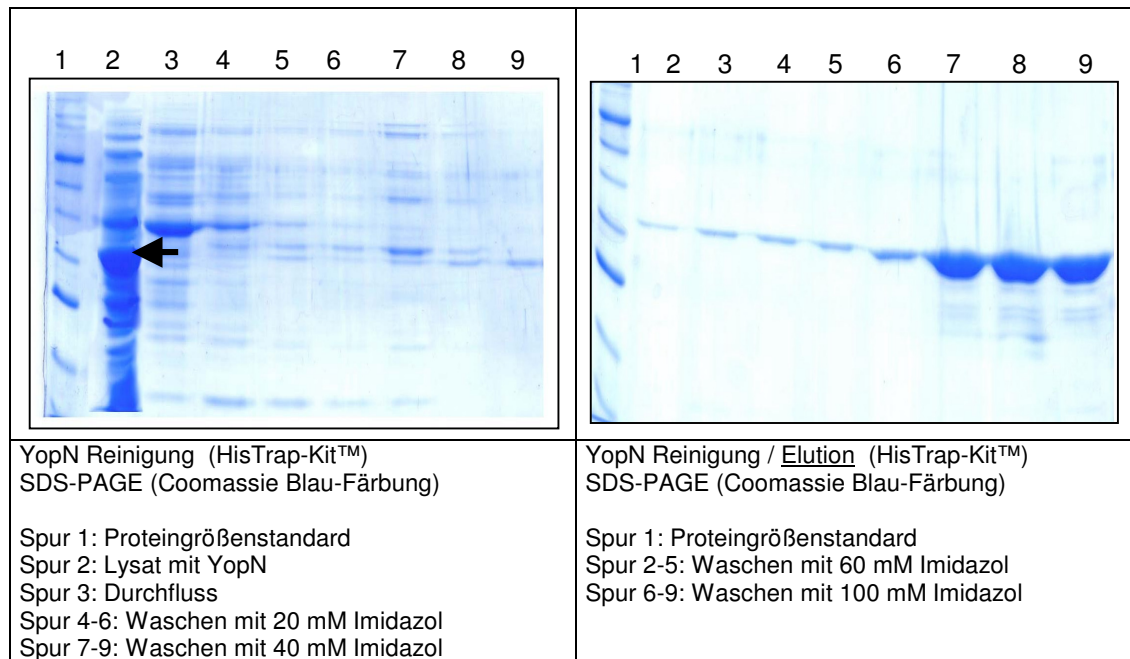
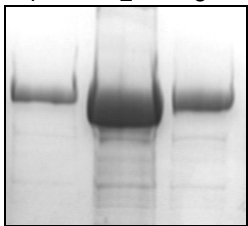
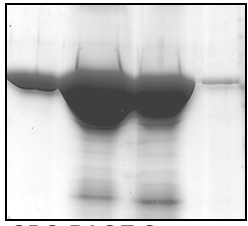
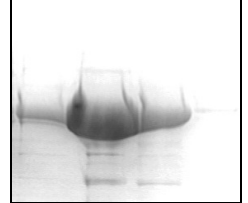


Abbildung 8. Optimierung der Proteinreinigung durch stufenweise Erhöhung der Imidazolkonzentration im Waschpuffer am Beispiel YopN. Der Pfeil markiert das rekombinante Protein im Lysat.

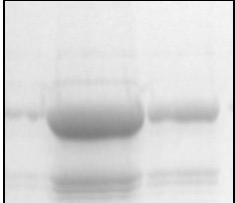
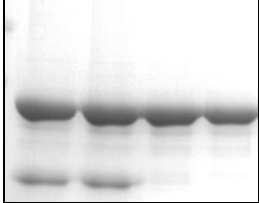
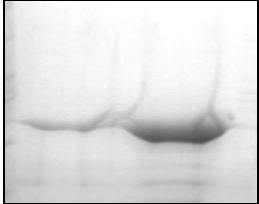
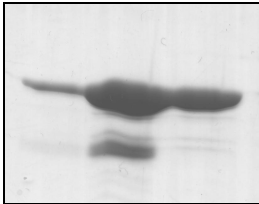
In **Abbildung 8** ist am Beispiel des YopN zu sehen, dass die Elution dieses Proteins ab einer Imidazolkonzentration von 100 mM stattfindet. Die Imidazolkonzentration des vorhergehenden Waschschrittes kann daher als Standard im Waschpuffer verwendet werden.

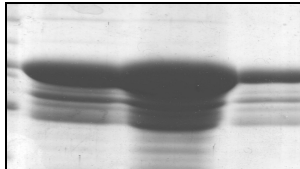
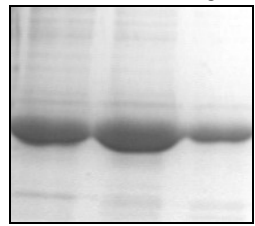
Gleichzeitig mit der Optimierung der Reinigung über HisTrap-Säulen wurden für jedes Yop die optimalen Lysebedingungen ermittelt, um der Wirtszellkultur die größtmögliche Menge an rekombinantem Protein zu entziehen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 9** zusammengefasst.

Tabelle 9. Optimierte Reinigungsbedingungen der einzelnen Yops

Antigen	Lysebedingungen	Waschpuffer	Elution
recYopO	<p>Lysepuffer: 8 M Urea 10 mM Phosphatpuffer (PP) 60 mM Imidazol 1% (w/vol) Tween</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pellet mit Sörensenpuffer resuspendieren - Ultraschall 600W/cm², 5x 30 sec, je 60 sec Pause - Zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Pellet mit Lysepuffer resuspendieren - Ultraschall 600W/cm², 5x 30 sec, je 60 sec Pause - Zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Überstand ist zellfreies Lysat - Pellet nochmals mit Lysepuffer bei 60 °C im Thermomixer lysieren, dann zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Überstand: zellfreies, proteinhaltiges Lysat 	8 M Urea 10 mM PP 60 mM Imidazol	<p>8 M Urea 10 mM PP 300 mM Imidazol</p>  <p>SDS-PAGE Spur 1-3: Elutionsreihe YopO</p>
recYopH	<p>Lysepuffer: 8 M Urea 10 mM PP 40 mM Imidazol 10 mM Mercaptoethanol 1% (w/vol) Tween</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pellet mit Lysepuffer resuspendieren - 30 min bei Raumtemperatur und 45 min bei 60 °C im Thermomixer lysieren - Zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Überstand: zellfreies, proteinhaltiges Lysat 	8 M Urea 10 mM PP 40 mM Imidazol	<p>8 M Urea 10 mM PP 200 mM Imidazol</p>  <p>SDS-PAGE Spur 1-4: Elutionsreihe YopH</p>
recYopM	<p>Lysepuffer: 8 M Urea 10 mM PP 60 mM Imidazol 10 mM Mercaptoethanol 1% (w/vol) Tween</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pellet mit Lysepuffer resuspendieren - 60 min bei Raumtemperatur auf Wippe lysieren - Zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Überstand: zellfreies, proteinhaltiges Lysat 	8 M Urea 10 mM PP 60 mM Imidazol	<p>8 M Urea 10 mM PP 300 mM Imidazol</p>  <p>SDS-PAGE Spur 1-4: Elutionsreihe YopM</p>

Fortsetzung Tabelle 9

recLcrV	<p>Lysepuffer: 8 M Urea 10 mM PP 60 mM Imidazol 1% (w/vol) Tween</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pellet mit Lysepuffer resuspendieren - Ultraschall 600W/cm², 5x 30 sec, je 60 sec Pause - Zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Überstand: zellfreies, proteinhaltiges Lysat 	8 M Urea 10 mM PP 60 mM Imidazol	<p>8 M Urea 10 mM PP 300 mM Imidazol</p>  <p>SDS-PAGE Spur 1-3: Elutionsreihe LcrV</p>
recYopT	<p>Lysepuffer: 6 M Guanidinhydrochlorid 10 mM PP 80 mM Imidazol 10 mM Mercaptoethanol 1% (w/vol) Tween</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pellet mit Lysepuffer resuspendieren - 1 h bei Raumtemperatur auf Wippe lysieren - Zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Überstand: zellfreies, proteinhaltiges Lysat 	8 M Urea 10 mM PP 80 mM Imidazol	<p>8 M Urea 10 mM PP 500 mM Imidazol</p>  <p>SDS-PAGE Spur 1-4: Elutionsreihe YopT</p>
recYopD	<p>Lysepuffer: 6 M Guanidinhydrochlorid 10 mM PP 40 mM Imidazol 1% (w/vol) Tween</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pellet mit Lysepuffer resuspendieren - 1 h bei Raumtemperatur auf Wippe lysieren - Zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Überstand: zellfreies, proteinhaltiges Lysat 	6 M GuHCL 10 mM PP 40 mM Imidazol	<p>6 M GuHCL 10 mM PP 200 mM Imidazol</p>  <p>SDS-PAGE Spur 1-3: Elutionsreihe YopD</p>
recYopN	<p>Lysepuffer: 8 M Urea 10 mM PP 40 mM Imidazol 1% (w/vol) Tween</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pellet mit Lysepuffer resuspendieren - 1 h bei Raumtemperatur auf Wippe lysieren - Zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Überstand: zellfreies, proteinhaltiges Lysat 	8 M Urea 10 mM PP 40 mM Imidazol	<p>8 M Urea 10 mM PP 100-300 mM Imidazol</p>  <p>SDS-PAGE Spur 1-3: Elutionsreihe YopN</p>

recYopP	Lysepuffer: 8 M Urea 10 mM PP 40 mM Imidazol 1% (w/vol) Tween - Pellet mit Lysepuffer resuspendieren - 1 h bei Raumtemperatur oder bei 60 °C auf Wippe lysieren - Zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Überstand: zellfreies, proteinhaltiges Lysat	8 M Urea 10 mM PP 40 mM Imidazol	8 M Urea 10 mM PP 200 mM Imidazol  SDS-PAGE Spur 1-3: Elutionsreihe YopP
recYopE	Lysepuffer: 8 M Urea 10 mM Phosphatpuffer (PP) 40 mM Imidazol 1% (w/vol) Tween - Pellet mit Sörensenpuffer resuspendieren - Ultraschall 600W/cm ² , 5x 30 sec, je 60 sec Pause - Zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) - Pellet mit Lysepuffer resuspendieren - Ultraschall und Zentrifugieren s.o. Überstand: zellfreies, proteinhaltiges Lysat - Pellet nochmals mit Lysepuffer bei 60 °C im Thermomixer lysieren, dann zentrifugieren (10 min, 15.000 x g, 4 °C) Überstand: zellfreies, proteinhaltiges Lysat	8 M Urea 10 mM PP 40 mM Imidazol 2. Waschschrift: 150 mM Imidazol	8 M Urea 10 mM PP 300 mM Imidazol  SDS-Page Spur 1-3: Elutionsreihe YopE

In Kooperation mit der Firma Labor Diagnostik GmbH Leipzig konnten die bisher manuell mit einer Spritze befüllten Nickelsäulen an das Chromatographiesystem ÄKTA™ *purifier* angeschlossen werden. Unter Verwendung der in der **Tabelle 9** aufgeführten optimierten Bedingungen konnte der Proteinertag durch die präziseren Wasch- und Elutionsschritte, ohne den bei der manuellen Durchführung unvermeidlichen Lufteintrag, noch gesteigert werden. Eine weitere Verbesserung konnte mit der Kopplung einer *E. coli*-Affinitätssäule erzielt werden. In diesem zweiten Chromatographieschritt wurden den gereinigten Yops bei Bedarf noch vorhandene Fremdproteine des *E. coli*-Wirtsstammes entzogen, indem diese Proteine an die *E. coli*-Antikörper der Säulenmatrix banden.

3.4 Material und Methoden, Teil 2:

Herstellung von Hyperimmunseren und Immunoblots sowie Charakterisierung der Antikörperantwort gegen *Y. enterocolitica* beim Schwein

3.4.1 Bereits vorhandene Hyperimmunseren

Im Rahmen vorhergehender Arbeiten wurden Schweine und Kaninchen zur Serumgewinnung mit natürlich exprimierten Yops und dem rekombinanten YopO immunisiert.

Dazu wurden pro Antigen jeweils zwei Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ sowie zwei Hybridschweine (Landrasse x Pietrain) immunisiert. Das Yop-Gemisch sowie das rekombinante YopO wurden auf 100 µg Proteinmenge eingestellt. Mittels inkomplettem Freund'schen Adjuvans (Fa. Sigma, Deisenhofen) wurde eine Wasser-in-Öl-Emulsion (500 µl Suspension/500 µl Freund'sches Adjuvans) hergestellt. Diese wurde den insgesamt vier Kaninchen intradermal und den vier Schweinen intramuskulär verabreicht. Die Gewinnung der Hyperimmunseren bei den Kaninchen erfolgte eine Woche nach der letzten Applikation unter Allgemeinanästhesie (1 mg/kg Xylazin mit 50 mg/kg Ketamin, i.m.) durch Ausbluten der Tiere mittels intrakardialen Blutentzug. Bei den Schweinen erfolgte das Ausbluten nach der Tötung mit dem Bolzenschußgerät.

Die Seren konnten während dieser Arbeit zur Überprüfung der Expression der rekombinanten Proteine im Western Blot herangezogen werden.

3.4.2 Tiere und Probenmaterial

Im Rahmen der an diesem Institut durchgeführten Infektionsversuche mit Hybridschweinen (Landschwein x Edelschwein) standen aus drei Infektionsmodellen mit dem Erreger *Y. enterocolitica* Serumproben für die Charakterisierung der systemischen Antikörperantwort zur Verfügung. Außerdem wurden für die vorliegende Arbeit nach der Tötung der Tiere die abgesonderte Flüssigkeit auf der Schleimhautoberfläche verschiedener Darmabschnitte sowie Gelenksflüssigkeit zur Untersuchung der lokalen Antikörperantwort entnommen. Eine Darstellung des Probenmaterials kann **Tabelle 10** entnommen werden.

Tabelle 10. Probenmaterial aus Infektionsversuchen

Anzahl der Proben je Infektion	Serum	Tränenflüssigkeit	Speichel	Jejunum	Ileum	Cäcum	Kolon	Synovia	Probenzahl nach Tieren
2 Hybridschweine Infektionsdosis 1×10^{10} KBE	14	8	8	2	2	2	2	2	40
2 Hybridschweine Infektionsdosis 5×10^{11} KBE	16	4	4	2	2	2	2	2	34
9 Hybridschweine Infektionsdosis 5×10^{11} KBE	99	18	18	9	9	9	9	9	180
9 Hybridschweine Negativkontrolle	99	18	18	9	9	9	9	9	180
Probenzahl nach Material	228	48	48	22	22	22	22	22	434

Desweiteren wurden für die Herstellung eigener Hyperimmunseren (genaue Beschreibung der Durchführung unter **Punkt 3.4.7**, Gewinnung von Hyperimmunseren) gegen die einzelnen Yops neun Ferkel immunisiert, ein zehntes verblieb als Negativkontrolle. Acht dieser Ferkel erhielten als Antigen jeweils eines der acht rekombinanten Proteine, eines erhielt einen Mix aus verschiedenen Yops. Die Immunisierung wurde in den Versuchstierstallungen des Bundesinstitutes für Risikobewertung in Berlin durchgeführt.

Außerdem wurden zehn Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ immunisiert. Zwei der Kaninchen erhielten als Antigen das Membranprotein YadA. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden weitere acht Kaninchen mit jeweils einem der acht rekombinanten Proteine immunisiert. Diese Immunisierung wurde in den Stallungen des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig durchgeführt.

3.4.3 Verwendete Immunoblots

Zusätzlich zu den selbst hergestellten Immunoblots wurden zum Vergleich und auch zum Screening größerer Mengen an Seren, wie beispielsweise bei der Auswahl Yersinien-freier Muttersauen und Ferkel für die Immunisierung, der kommerziell erhältliche *recomBlot* der Firma Mikrogen, Martinsried, sowie im Institut hergestellte Immunoblots auf Basis natürlich exprimierter Yops verwendet. Dazu wurden die Yersinien in LB-Boullion (Fa. Difco, Heidelberg), bei 28 °C über Nacht zum Wachstum gebracht. 2 % dieser Über-Nacht-Kultur wurde in frische LB-Boullion überimpft und

die Temperatur auf 37 °C erhöht. Nach zwei Stunden wurde 5 mM EDTA als Calcium-Chelator zugegeben. Dadurch kommt es zur Expression der Yops. Die Proteine werden anschließend aus dem zentrifugierten Kulturüberstand präzipitiert, mit SDS-Probenpuffer nach Lämmli aufgekocht und im präparativen Proteingel verwendet.

3.4.4 Herstellung der Immunoblots für Vorversuche

Mit diesen ersten Immunoblots sollten Antikörper in Serum- und Sekretproben der ersten zwei x zwei Ferkel aus den *Yersinia*-Infektionsversuchen detektiert werden. Für einen präparativen Blot wurde ein 12 %iges Proteingel (SDS-PAGE) mit einer entsprechend großen Tasche zum Auftragen größerer Proteinmengen hergestellt (siehe **Punkt 3.2.14**). Die beiden hierfür verwendeten Antigene YadA und YopO wurden einzeln oder auch gemischt aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgte das Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran, wie unter **Punkt 3.2.16** erklärt.

Andere Immunoblots wurden so hergestellt, dass acht Taschen pro Gel mit jeweils einem Yop beladen wurden. Die Membran wurde nach dem Blotten mit dem roten Farbstoff Ponceau S (Sigma Aldrich, Hannover) angefärbt, um die nun sichtbaren Proteinbanden leicht markieren zu können. Nach dem Entfärben mit PBS-T konnte die Membran dank der Markierung in einzelne Streifen geschnitten werden, die dann für die Untersuchung von weiteren Serumproben zur Verfügung standen.

3.4.5 Herstellung der Teststreifen - Auflinierung der Yops

Die gereinigten, vollständig in Lösung vorliegenden Proteine wurden einzeln in der Reihenfolge YopO, YopH, YopM, LcrV, YopT, YopD, YopN, YopP, YopE horizontal im Abstand von 7 mm auf eine Nitrocellulosemembran aufgesprüht. Für diese Technik wurde das Gerät Linomat 4 (Fa. Camag, Berlin) verwendet: Dabei wird die Probenflüssigkeit mittels Stickstoff automatisch aus einer Nadelspitze auf die Membran gesprüht. Die Tischbewegung wird so gesteuert, dass die Probe gleichmäßig über die gewählte Bandenlänge aufgetragen wird. Die Auftragskonzentration betrug 1 µg/cm, die Nitrocellulosemembran (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel) erhielt auf der Rückseite eine Verstärkung mit Klebefolie zur Erhöhung der Reißfestigkeit. Die zum Linomat 4 dazugehörige Hamiltonspritze wurde nach jedem Sprühvorgang 20 x mit destilliertem Wasser durchgewaschen, bevor das jeweils nächste Antigen eingefüllt wurde. Nach der Auflinierung der Yops erfolgte die Blockierung der freien Bindungsstellen der Membran mit 5 %iger Magermilch in PBS-T. Die Membran wurde anschließend mit einem Schneidegerät in 2,5 mm breite Streifen geschnitten und getrocknet, die Blotstreifen sollten dann für die Charakterisierung der Antikörperantwort in den verfügbaren Proben genutzt werden.

3.4.6 Infektionsmodell Schwein - Gewinnung verschiedener Proben

Parallel zu dieser Arbeit fanden im Rahmen der Untersuchungen eines weiteren Promovenden drei Infektionsversuche mit *Y. enterocolitica* im Versuchstierstall des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen an 2 x 2 und 1 x 9 Ferkeln statt. Dabei konnten Serumproben, Tränen- und Speichelflüssigkeit, Proben von Darmsekreten und Synovia für die hier vorliegende Untersuchung entnommen werden.

3.4.6.1 Gewinnung der Serumproben

Den Ferkeln wurde zweimal pro Woche in Rückenlage Blut aus der V. jugularis entnommen. Die Entnahme erfolgte mit Vacuetten (Typ „serum clot activator“, Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen) in Kombination mit „Holdex“-Einwegröhrchenhaltern der gleichen Firma sowie den passenden Kanülen in gelb oder rosa. Die Vacuetten wurden zentrifugiert (10 min, 4.000 x g, 4 °C) so dass das Serum danach abpipettiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bis zur weiteren Verwendung bei –21 °C eingefroren werden konnte.

Der Einsatz der Seren erfolgte 1:100 verdünnt mit PBS-T.

3.4.6.2 Gewinnung der Speichelproben

Jedem Ferkel wurde ein Wattetupfer (Fa. Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg) für etwa 2 min in die backenseitige Maulhöhle gehalten, um eine ausreichende Einspeichelung zu gewährleisten. Die Enden der eingespeichelten Wattetupfer wurden anschließend in Milchröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) auf abgeschnittene Pipettenspitzen gesteckt. Diese Vorgehensweise ermöglichte eine Trennung bei der Zentrifugation (10 min, 4.000 x g, 4 °C) zwischen gewonnenem Speichel und den Tupfern. Die Speichelproben wurden dann in 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße umgefüllt und bei – 21 °C bis zur Untersuchung eingefroren.

Der Einsatz der Speichelproben erfolgte 1:5 verdünnt mit PBS-T.

3.4.6.3 Gewinnung der Tränenflüssigkeit

Die Tränenflüssigkeit wurde in Rückenlage durch Ausstreichen der oberen und unteren Lidbindehaut eines Auges mittels beider Enden eines Wattestäbchens (Fa. Hartmann, Heidenheim) aufgenommen. Jedes Wattestäbchen wurde dann in der Mitte durchgeschnitten und beide Teile in einem mit 1 ml PBS gefüllten Reagenzröhrchen eingetaucht und geschwenkt. Die Zentrifugation der Wattestäbchen erfolgte anschließend bei 4.000 x g für 10 min in speziell präparierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Die Böden der 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden hierfür mit einer Einmalkanüle durchstoßen und dann in die Öffnung von 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesteckt. In die durchgestochenen Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden dann die Enden des Wattestäbchens sowie das

PBS aus dem jeweiligen Reagenzröhrchen eingefüllt und anschließend bei 4.000 x g für 10 min zentrifugiert. Die in den 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangene Tränenflüssigkeit wurden nach diesem Schritt bis zur weiteren Verwendung bei -21 °C eingefroren.

Der Einsatz der Tränenflüssigkeit erfolgte 1:5 verdünnt mit PBS-T.

3.4.6.4 Gewinnung der Darmsekrete

Die Darmsekrete wurden im Verlauf der Sektion der Tiere gewonnen. Aus Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon wurde jeweils kurz vor dem Übergang in den nächsten Darmabschnitt ein je ca. 2 x 7 cm großes Stück präpariert, welches durch Schwenken für ca. 10 sec in PBS von Kotbestandteilen gereinigt wurde. Auf jeden der so gereinigten Darmabschnitte wurde dann ein ebenfalls ca. 2 x 7 cm großer, 7-lagiger Zellstoffstreifen gepresst, um die Flüssigkeit auf den jeweiligen Darmabschnitten aufzunehmen. Nach 15 min wurden die Zellstoffstreifen in Eppendorf-Reaktionsgefäße gesteckt, die in gleicher Weise wie die Eppendorf-Reaktionsgefäße zur Zentrifugation der Tränenflüssigkeit präpariert waren. Die Zentrifugation erfolgte bei 4000 x g für 10 min, bevor die Darmsekretproben bei -21°C bis zu ihrer weiteren Verwendung eingefroren wurden.

Der Einsatz der Darmsekretproben erfolgte 1:5 verdünnt mit PBS-T.

3.4.6.5 Gewinnung der Synovia

Die Gelenksflüssigkeit ließ sich ebenfalls während der Sektion der experimentell infizierten Tiere gewinnen. Dazu wurden die Karpal- und Tarsalgelenke der Schweine desinfiziert, bevor der Gelenkzwischenraum mit einer Kanüle punktiert und evtl. bereits austretende Synovia in einem 2 ml-Eppendorfgefäß aufgefangen wurde. Auf die Kanüle wurde anschließend eine 2 ml-Spritze aufgesetzt und das jeweilige Gelenk mit 1 ml steriler Ringerlösung gespült, um die etwas zähflüssigere Synovia möglichst vollständig zu gewinnen.

Der Einsatz der Synovia erfolgte 1:10 verdünnt mit PBS-T.

3.4.7 Gewinnung von Hyperimmunseren

Bevor die Yops für die Immunisierung von Ferkeln und Kaninchen eingesetzt werden konnten, mussten jegliche reizende Stoffe wie z.B. Harnstoff durch Dialyse gegen H₂O_{bidest} aus der Lösung entfernt werden. Danach wurden die jeweiligen Proteinlösungen in einem Lyophilisator (Fa. Christ, Osterode) nach Anweisung des Herstellers gefriergetrocknet und zum Zeitpunkt der Anwendung mit 0,5 – 1 ml steriler Ringerlösung solubilisiert.

3.4.7.1 Immunisierung von Kaninchen

Der erste Immunisierungsversuch fand mit dem rekombinant hergestellten Protein YadA statt. Zwei Kaninchen der Rasse Weisse Neuseeländer wurden 5 x im Abstand von 1 Woche jeweils mit rund 100 µg Antigen immunisiert. Die Applikation erfolgte intravenös in die Ohrrendvene. Die Gewinnung der Hyperimmunseren erfolgte eine Woche nach der letzten Applikation unter Allgemeinanästhesie (1 mg/kg Xylazin mit 50 mg/kg Ketamin, i.m.) durch Ausbluten der Tiere mittels intrakardialen Blutentzug.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden weitere Hyperimmunseren im Kaninchen gegen die übrigen rekombinant hergestellten Yops gewonnen. Diesmal wurden acht Kaninchen mit jeweils einem Yop (YopH, YopM, LcrV, YopT, YopD, YopN, YopP, YopE) intradermal immunisiert. Mittels inkomplettem Freund'schen Adjuvans (Fa. Sigma, Deisenhofen) wurde dafür eine Wasser-in-Öl-Emulsion (ca. 100 µg Antigen in 500 µl Ringerlösung + 500 µl inkomplettes Freund'sches Adjuvans) hergestellt und diese Mischung in 12 – 16 Depots streng intradermal in die Rückenhaut der Tiere injiziert. Für die zwei nachfolgenden Boosterungen im Abstand von einer Woche wurde bei der intradermalen Applikation auf das inkomplette Freund'sche Adjuvans verzichtet. Beginnend mit der Grundimmunisierung erfolgte im Wochenabstand bei jedem Tier eine Blutprobenentnahme aus der Ohrrendvene.

3.4.7.2 Immunisierung von Schweinen

Im Rahmen eines Werkvertrages mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin sollten ähnliche Hyperimmunseren auch vom Schwein gewonnen werden.

Um ein spezifisches Hyperimmunserum zu erhalten, mussten die Schweine in diesem Fall nicht nur frei von einer Infektion mit *Y. enterocolitica* sein, sondern durften auch keine Antikörper gegen die Virulenzfaktoren dieses Erregers besitzen. Es eigneten sich somit nur Ferkel von Yersinien-freien Sauen, die auch über die aufgenommene Kolostralmilch der Sau keine passive Immunität in Form von maternalen Antikörpern gegen Yops aufwiesen.

Untersucht wurden folgende Schweinebestände: dem Bundeshybridzuchtprogramm (BHZP) angeschlossene Betriebe in Welle, Ellringen, Melzingen, Langenheide und Steinbeck; Serumproben von 15 Sauen aus einem der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft angegliederten Bestand in Mariensee sowie ein Betrieb der Agrar GmbH Störmthal-Seifertshain. Die Serumproben wurden mit den oben beschriebenen Teststreifen sowie dem kommerziell erhältlichen recomBlot der Firma Mikrogen immunologisch auf Antikörper gegen Yersinien getestet.

a) Anwendung der Teststreifen

Dafür wurden die im Vorfeld hergestellten Nitrocellulosestreifen beschriftet und mit 0,1%igem PBS-Tween angefeuchtet. Pro Streifen wurde das Serum eines Schweines mit der Verdünnung 1:200

verwendet. Verdünnt wurde mit 0,1%igem PBS-Tween. Die Streifen inkubierten 1 h bei Raumtemperatur in Milchglasröhrchen auf einer Wippe. Im Anschluss wurden die Streifen zur Entfernung nicht gebundener Antikörper dreimal mit PBS-T gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-Anti-Schwein IgG (h-l) der Firma Dakocytomation, Hamburg, in einer Gebrauchsverdünnung von 1:1500 eingesetzt. Es folgte eine weitere Stunde Inkubation bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Streifen 10 min in PBS-T sowie weitere 10 min in reinem PBS gewaschen, anschließend erfolgte die Detektion der Antikörperantwort. Die dafür verwendete Lösung bestand aus 4 ml 4-Chlor-1-Naphtol (3mg/ml) in Methanol, 20 ml PBS und 18 µl 30%igem H₂O₂.

Bei der Verwendung der recomBlot-Streifen (Fa. Mikrogen, Martinsried) wurde nach Gebrauchsinformation des Herstellers vorgegangen, das Testprinzip bleibt das Gleiche.

b) Auswahl der geeigneten Population

Zusätzlich zur serologischen Untersuchung fand eine bakteriologische Überprüfung des Kots der Tiere per Direktausstrich auf aerob bebrüteten CIN-Platten und nach 48 h aerober Anreicherung in ITC-Bouillon statt.

Zwar verlief die bakterielle Untersuchung der Kotproben der untersuchten Bestände negativ, aber die Serumproben ließen größtenteils sowohl bei Sauen als auch bei Ferkeln eine bereits bestehende Antikörperantwort gegen natürlich exprimierte (**Abbildung 9**) und rekombinante (**Abbildung 10**) Yops erkennen.

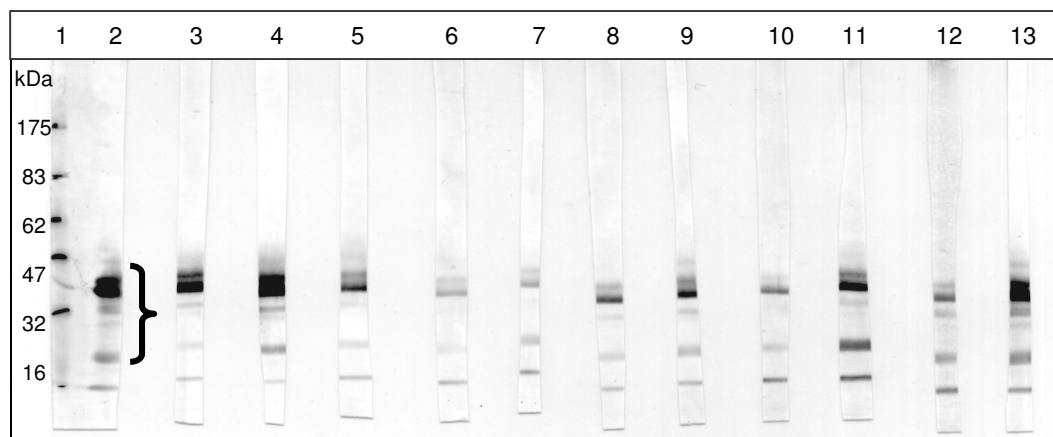


Abbildung 9. Western Blot mit Serumproben von 11 Sauen aus dem Bestand Melzingen mit deutlich positiver Antikörper-Antwort. Als Antigene wurden natürlich exprimierte Yops verwendet.

Blotstreifen 1:	Proteingrößenstandard
Blotstreifen 2:	Positivkontrolle (die geschweifte Klammer umfasst den Bereich der natürlich exprimierten Yops, eine exakte Benennung der einzelnen Yops ist bei einem natürlich exprimierten Gemisch nicht möglich)
Blotstreifen 3 – 13:	Antikörper-Antworten der elf Sauen

Auch im Western Blot gegen die rekombinanten Yops war eine deutliche Antikörperantwort zu erkennen (**Abbildung 10**).

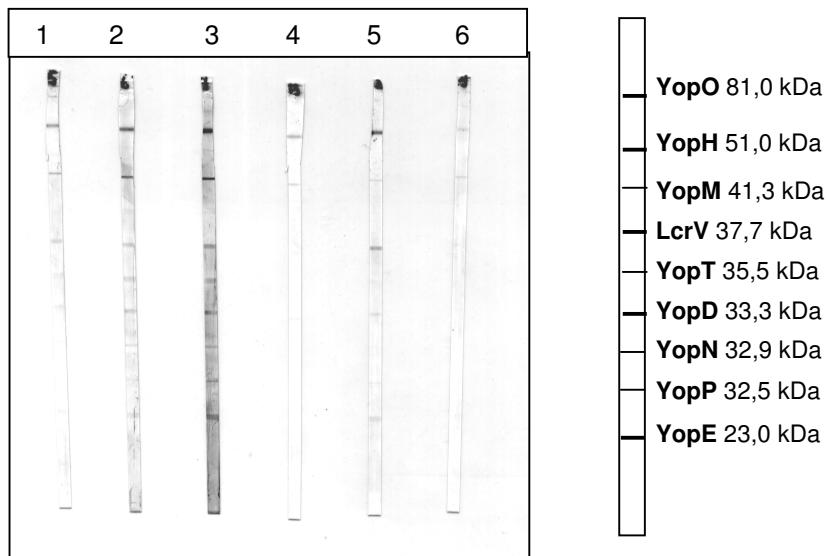


Abbildung 10. Blotstreifen mit Serumproben von sechs Sauen aus den Beständen Welle und Steinbeck. Als Antigen wurden rekombinante Yops aufliert. Blotstreifen 1 – 6: spezifische Antikörper-Antworten der sechs Sauen gegen *Y. enterocolitica*

Von den getesteten drei Sauen der Agrar GmbH Störmthal dagegen zeigte eine Sau eine fraglich positive Antikörperantwort, während die anderen zwei Sauen negativ waren. Auch bei einer stichprobenartigen Überprüfung der Saugferkel konnte keine Antikörperantwort gegen Yops detektiert werden (**Abbildung 11**).

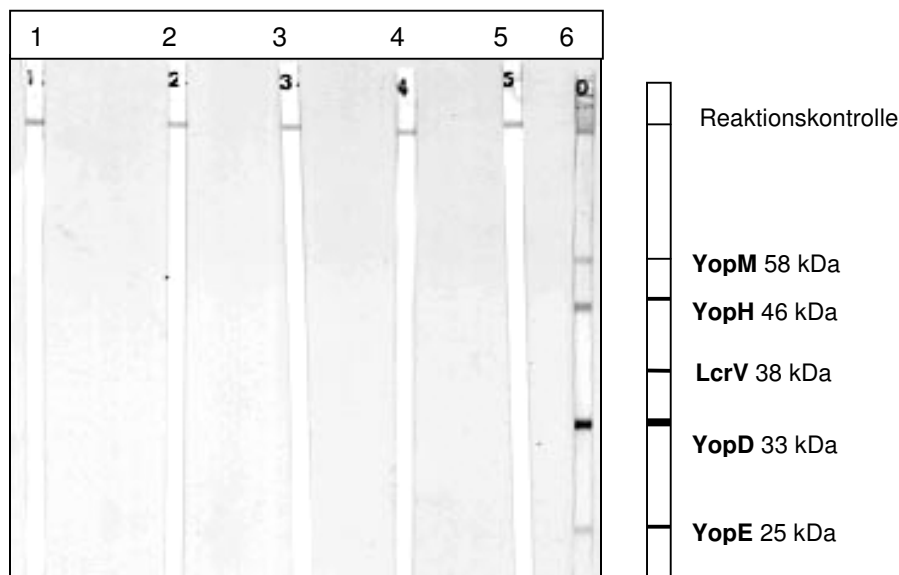


Abbildung 11. Blotstreifen der Firma Mikrogen (recomBlot) mit Serumproben von fünf untersuchten Ferkeln. Insgesamt wurden elf Ferkel der Agrargemeinschaft Störmthal-Seifertshain mit negativem Ergebnis auf Antikörper gegen *Y. enterocolitica* untersucht.

Blotstreifen 1 – 5: Antikörperantwort der Ferkel 1 bis 5 gegen *Y. enterocolitica*
 Blotstreifen 6: Positivkontrolle recomBlot

Von den untersuchten Schweinen waren demnach nur die Ferkel der Agrargemeinschaft Störmthal-Seifertshain zur Immunisierung geeignet.

Die letztendlich ausgewählten 21 Tage alten Ferkel (10 Hybridschweine von 8,0 bis 10,5 kg Gewicht) wurden von der Mutter abgesetzt und in die Isolier-Stallungen für Versuchstiere des Bundesinstitutes für Risikobewertung in Berlin verbracht. Um eine ausreichende Bildung von Antikörpern zu gewährleisten, wurde die weitere Ausreifung des Immunsystems der Ferkel abgewartet und die Grundimmunisierung erst im Alter von 5 1/2 Wochen durchgeführt. Gleichzeitig mit dieser ersten Immunisierung erfolgte eine Kontrolle des Negativstatus der Tiere (**Abbildung 12**).

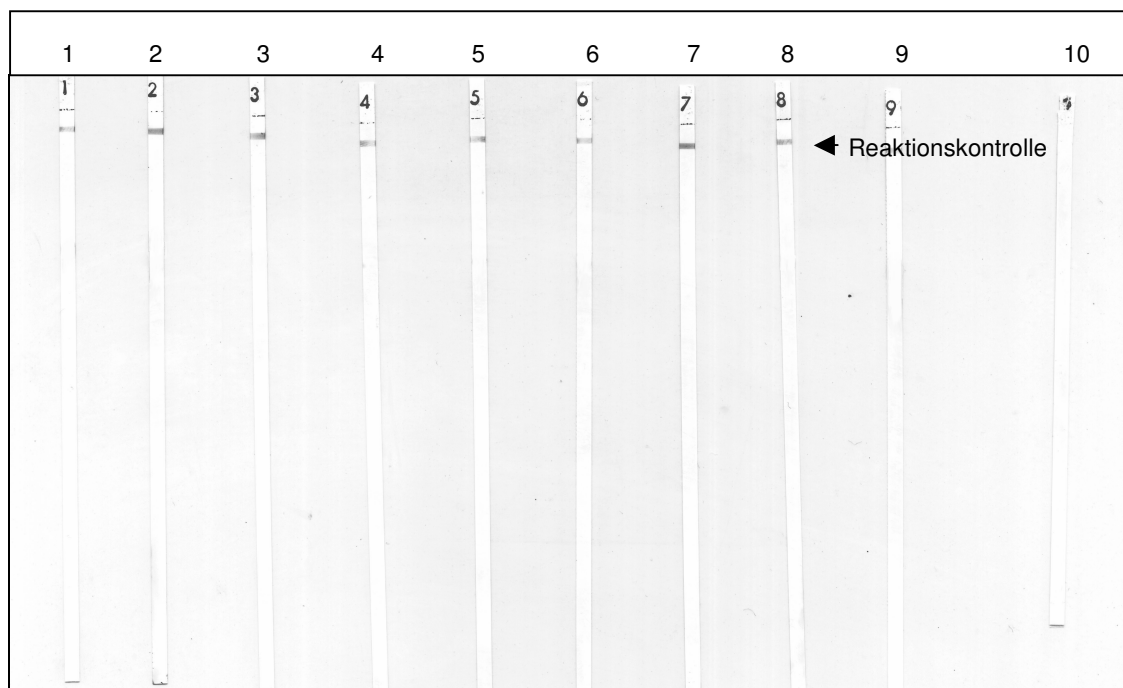


Abbildung 12. Prüfung der für die Immunisierung ausgewählten zehn Ferkel auf *Y. enterocolitica*-Antikörper

Blotstreifen 1 – 10: spezifische Antikörper-Antwort der Ferkel 1 bis 10 gegen *Y. enterocolitica*

Im Laufe der Immunisierung wurde den Tieren zur Kontrolle der Antikörperbildung mehrmals Blut abgenommen und mit den hergestellten Blotstreifen untersucht.

c) Immunisierung

Grundimmunisierung: Bei der Grundimmunisierung wurden pro Schwein 150 µg des jeweiligen Yop-Proteins intramuskulär in zwei Depots verabreicht, bei den eingesetzten Proteinen handelte es sich um YopH, YopM, LcrV, YopT, YopN, YopP, YopE und YopD. Aufgrund der geringen vorhandenen Menge an YopD wurde dieses Protein während des gesamten Versuches mit einer Konzentration von 100 µg eingesetzt. Ein Schwein bekam eine Mischung verschiedener Yops (YopH 50 µg, LcrV 50 µg, YopT 50 µg, YopN 50 µg, YopP 35 µg, YopE 50 µg). Ein weiteres Schwein verblieb als Negativ-Kontrolle.

Boost I: Der erste Boost erfolgte 1 Woche später, die Konzentration wurde auf 200 µg erhöht (YopD 100 µg). Auch die Konzentration im Yop-Gemisch wurde auf jeweils 100 µg (YopP 80 µg, YopE 50 µg) erhöht.

Boost II: Beim zweiten Boost 2 Wochen später wurden die gleichen Konzentrationen wie beim 1. Boost verwendet.

Für YopN und YopT erfolgte noch eine Nachimmunisierung mit der doppelten Konzentration (400 µg).

Vor und während der Immunisierung erfolgte insgesamt dreimal eine Kontrolle der Antikörperbildung. Dafür wurde den Schweinen in Rückenlage mittels Vacuetten ca. 10 ml Blut aus der Vena jugularis externa entnommen. Das nach Zentrifugation gewonnene Serum wurde mit den Teststreifen, wie oben beschrieben, untersucht.

Das Entbluten der Schweine erfolgte unter vorhergehender Elektroschockbetäubung durch einen tiefen Halsschnitt zur Öffnung der dort befindlichen großen Blutgefäße.

Das aufgefangene Blut verblieb 1 h bei Raumtemperatur in einem Auffanggefäß, danach erfolgte eine Lösung des Blutkuchens. Das Auffanggefäß wurde mit Folie abgedeckt und weitere 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend erfolgte eine 14- bis 16-stündige Lagerung des Blutes bei +5 °C bis +3 °C bis zum nächsten Tag.

Am nächsten Tag wurde der Überstand (Serum und Erythrozyten) in 100 ml-Zentrifugengefäße abgefüllt, der Blutkuchen verblieb im Auffanggefäß. Zur Abtrennung der Erythrozyten wurde der Überstand dann bei 2.500 x g für 15 min zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde pro Schwein in 2-3 Gewebekulturflaschen á 200 ml sowie 4 Cryoröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) mit je 1,8 ml abgefüllt und bis zur Weiterbearbeitung bei -25 °C gelagert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Rekombinante Antigene

Mit den in **Tabelle 5** aufgelisteten Primern und den in **Tabelle 7** angegebenen PCR-Bedingungen konnten alle acht Yop-Gene in der korrekten Länge, wie sie zuvor anhand der Einträge in der EMBL-Nukleinsäure-Datenbank ermittelt wurden, amplifiziert werden.

Nachdem durch Expressionsversuche die geeigneten Vektoren und Wirtszellen ausgewählt waren, konnte jedes Yop in visuell beurteilbaren Mengen exprimiert werden. Für die weitere Optimierung der Expression durch Feineinstellung von Induktion und Inkubationszeiten (siehe **Tabelle 8**) wurden nur die Klone ausgesucht, bei denen das jeweilige Yop den größten Anteil am Gesamtzellprotein des exprimierenden *E. coli*-Stammes ausmachte (siehe **Abbildung 13**).

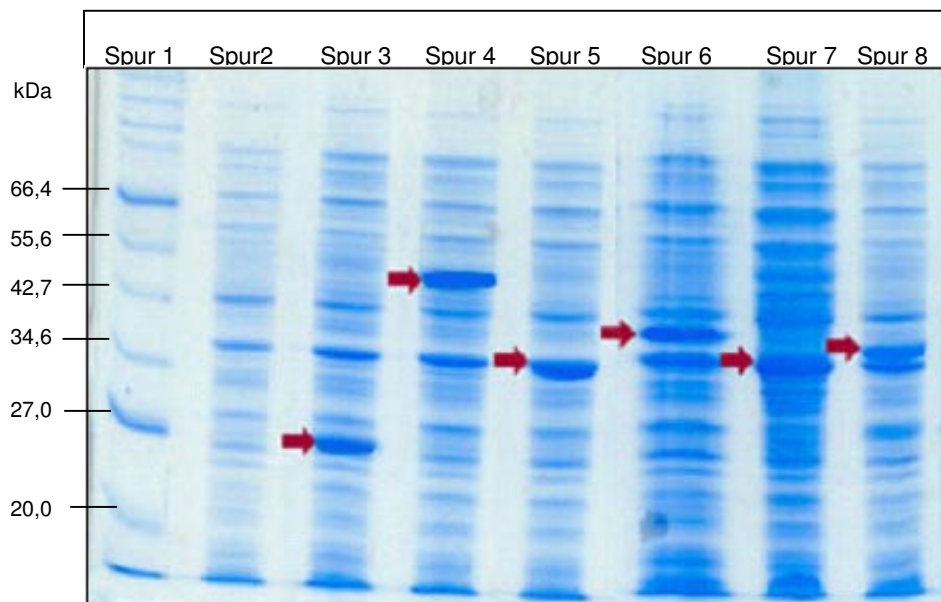


Abbildung 13. SDS-PAGE der Gesamtzellproteine verschiedener Yop-exprimierender *E. coli*-Stämme. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen markiert.

Spur 1: Proteingrößenstandard
 Spur 2: *E. coli* DE3 negativ-Kontrollstamm
 Spur 3: YopE-Expression
 Spur 4: YopM-Expression
 Spur 5: YopP-Expression
 Spur 6: YopD-Expression
 Spur 7: YopN-Expression
 Spur 8: LcrV-Expression

Der Klon YadA zeigte nur unmittelbar nach dem Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Amp Platten eine Expression, die weder nach Passage auf weitere Platten noch in Flüssigkultur reproduzierbar war. Da es sich bei dem Membranprotein YadA außerdem nicht um ein Effektor-Yop

handelt, wurde dieses Protein nicht für die Herstellung der Teststreifen verwendet, sondern diente lediglich für Vorversuche zur Immunisierung und der Herstellung von ersten Immunoblots.

Für die Expression der übrigen Yops war vor allem der Zeitraum nach der Induktion von entscheidender Bedeutung. Eine Überschreitung der für jedes Yop ermittelten optimalen Kultivierungszeiten hatte eine verminderte Expressionsleistung oder sogar, wie bei YopD der Fall, den vollständigen Abbau des Proteins zur Folge.

Bei der Prüfung verschiedener Aufreinigungsverfahren auf der Basis von Affinitätschromatographie und Elektroelution erwiesen sich die mit Nickel-Ionen beladbaren Säulen des HisTrap Kit, kombiniert mit imidazolhaltigen Wasch- und Elutionspuffern, als Mittel der Wahl. Ein Anschluß der HisTrap-Säulen an das vollautomatische ÄKTApurifier-System erleichterte das vormals manuelle Befüllen der Säulen und verbesserte nochmals Ertrag und Reinheit der Proteine. Vor allem der abschließende Lauf des jeweiligen Eluates über gekoppelte Säulen mit einer *E. coli*-Affinitätsmatrix erhöhte den Reinigungsgrad durch die Entfernung eventuell noch vorhandener *E. coli*-Proteine (siehe **Abbildung 14**).

Im Anschluß an die Aufreinigung wurde anhand eines Western Blots die Reinheit der Yops mittels eines *E. coli*-Serums überprüft. **Abbildung 14** zeigt am Beispiel YopH die Dokumentation einer Reinheitsüberprüfung, die für jedes Yop durchgeführt wurde. Proteinbanden, die nach der Reinigung vor allem bei YopN, YopP und YopT unterhalb der hauptsächlichen Bande des jeweiligen Yops noch im SDS-PAGE zu sehen waren, stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit Abbaubanden dar. Dies wird auch durch den Western Blot in **Abbildung 14 C** verdeutlicht. Hier ist links vom Größenstandard das ungereinigte YopH-Lysat als Antigen aufgetragen, rechts dagegen das gereinigte Endprodukt. Nach der Inkubation mit einem spezifischen *E. coli*-Serum binden die *E. coli*-Antikörper an die im Lysat noch enthaltenen *E. coli*-Proteine, während das gereinigte Endprodukt keine detektierbaren *E. coli*-Proteine mehr enthält.

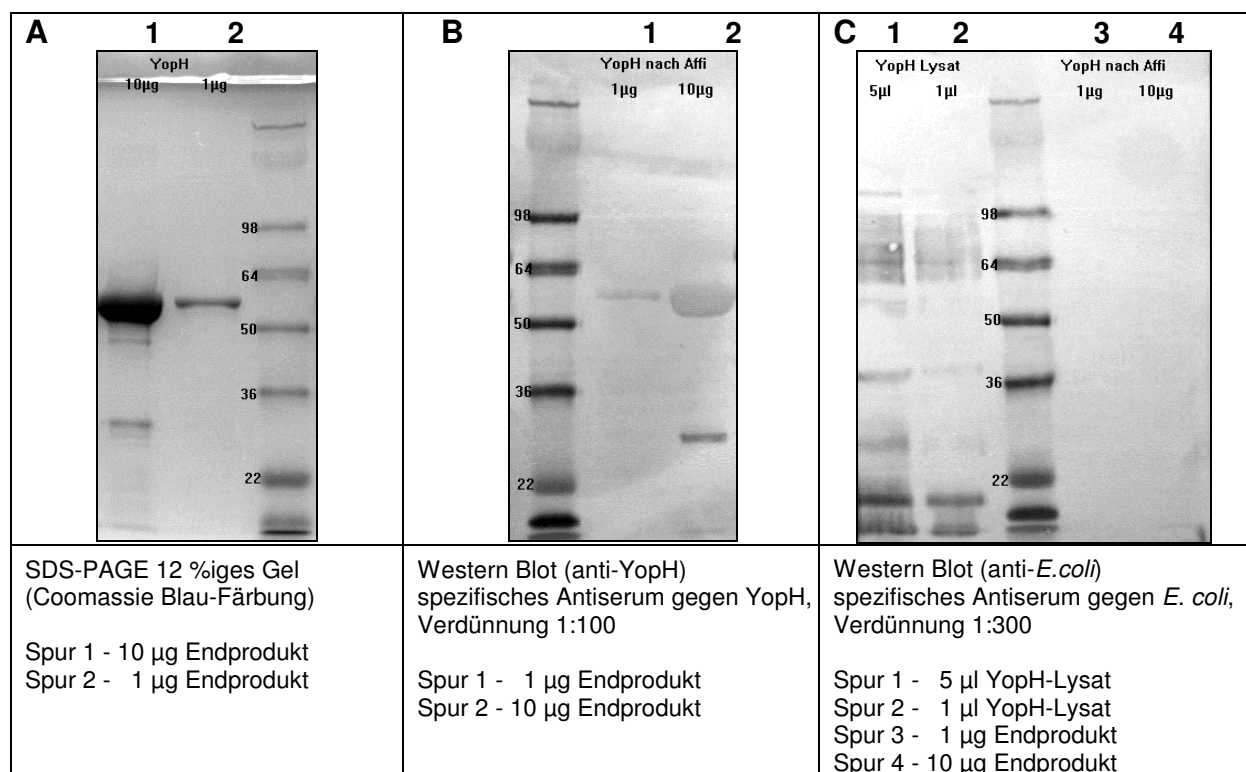


Abbildung 14. Dokumentation der Proteinreinheit am Beispiel YopH

A: YopH im Proteingel nach Abschluß der Reinigung

B: YopH im Western Blot nach Abschluß der Reinigung

C: YopH weist nach Affinitätschromatographie an Ni-Säule und an *E. coli*-Affinitätsmatrix im Western Blot (*E. coli*-Antiserum) im Gegensatz zum ungereinigten Lysat keine Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine mehr auf.

4.2 Ergebnis der Immunisierung der Schweine

Nach insgesamt 38 Tagen wurde das Serum der immunisierten Ferkel gewonnen. Die Überprüfung der Antikörperantwort der zehn Ferkel gegen die jeweiligen Yops erfolgte mit den im Verlauf der Arbeit hergestellten Teststreifen.

Obwohl Ferkel 1 bis Ferkel 8 mit nur jeweils einem Yop immunisiert wurden, zeigen die Teststreifen bei den meisten Schweinen eine Antikörperreaktion gegen mehrere Yops. Da sich die gebildeten Antikörper auch gegen das mit jedem Yop fusionierten HisTag-Protein richten, handelt es sich vermutlich um eine Kreuzreaktion mit den auflierten Antigenen, die ebenfalls noch mit dem His-Tag fusioniert sind. Inkubiert man die einzelnen Hyperimmunseren im Western Blot mit einem völlig artfremden Antigen, in unserem Experiment ein His-Tag-enthaltendes Prionprotein, so lassen sich deutliche Banden detektieren, was den Verdacht auf Kreuzreaktionen der His-Tag-Anteile unterstreicht. Bei der Inkubation eines jeden Serums mit natürlich exprimierten Yops ohne His-Tag-

Anteil lässt sich nur je eine Bande detektieren, so dass Kreuzreaktionen innerhalb der Yops oder eine alleinige His-Tag-Antigen-Antikörperreaktion somit ausgeschlossen werden können.

Die folgende **Abbildung 15** zeigt die Antikörperantwort zum Zeitpunkt der Schlachtung.

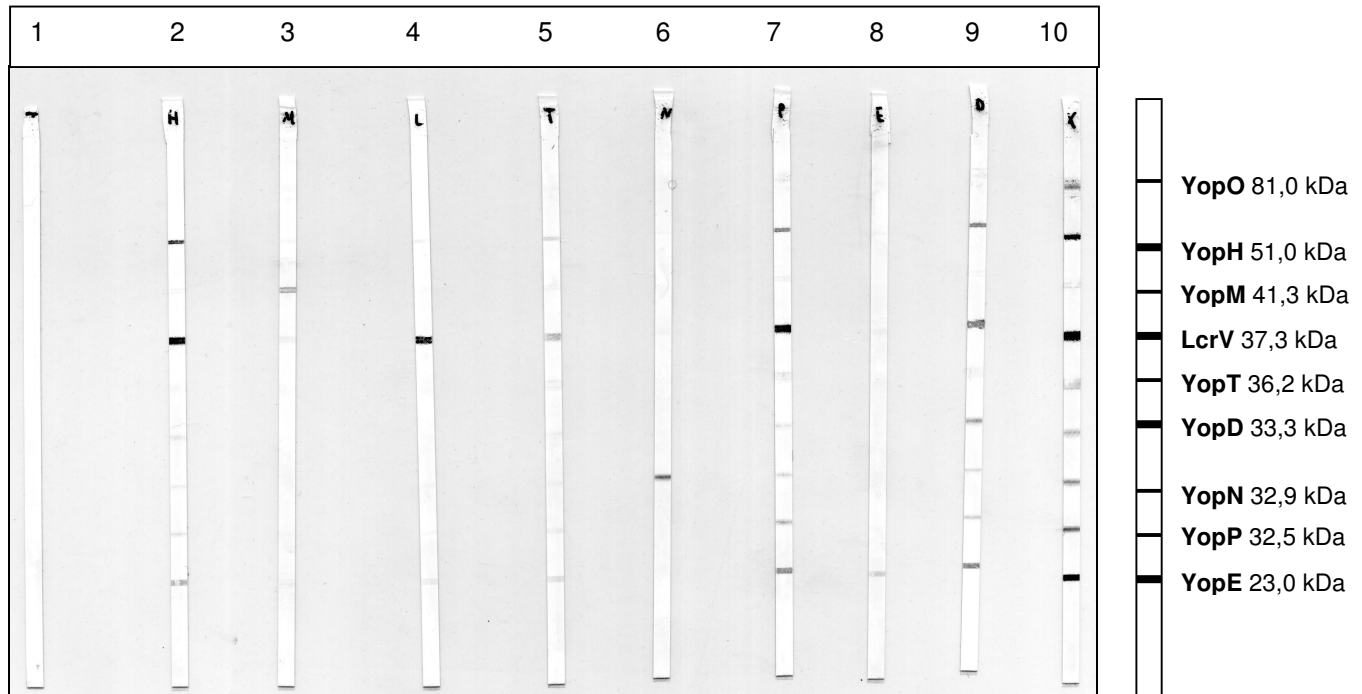


Abbildung 15. Antikörperantwort gegen die Yops zum Ende des Versuchszeitraumes (Tag 38 nach der Grundimmunisierung)

Blotstreifen 1:	nicht immunisiertes Ferkel 9, Negativkontrolle
Blotstreifen 2:	Ferkel 1, immunisiert mit YopH
Blotstreifen 3:	Ferkel 2, immunisiert mit YopM
Blotstreifen 4:	Ferkel 3, immunisiert mit LcrV
Blotstreifen 5:	Ferkel 4, immunisiert mit YopT
Blotstreifen 6:	Ferkel 5, immunisiert mit YopN
Blotstreifen 7:	Ferkel 6, immunisiert mit YopP
Blotstreifen 8:	Ferkel 7, immunisiert mit YopE
Blotstreifen 9:	Ferkel 8, immunisiert mit YopD
Blotstreifen 10:	Ferkel 10, immunisiert mit Yop-Gemisch

4.3 Ergebnis der Immunisierung der Kaninchen

Bei der Überprüfung der Kaninchen-Hyperimmunseren ergab sich bei der Verwendung der hergestellten Blotstreifen ein ähnliches Bild wie bei den Schweinen. Aus den obengenannten Gründen binden auch hier die Antikörper nicht nur an das Antigen, mit dem immunisiert wurde. Wird jedes Yop-Protein einzeln pro Streifen auf eine Membran geblottet und anschließend mit dem zugehörigen Kaninchenserum inkubiert, lässt sich jeweils eine starke Bande detektieren und somit die Immunogenität der Yops nachweisen (**Abbildung 16**).

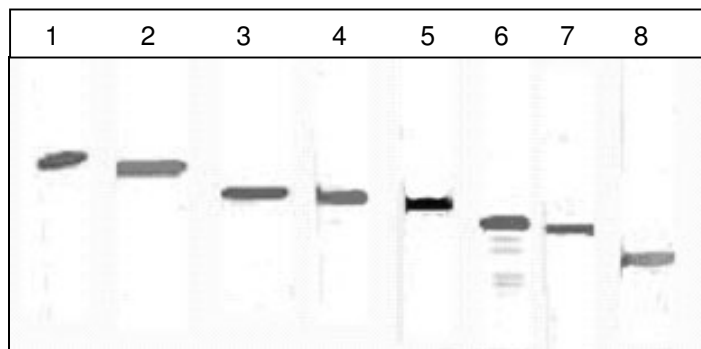


Abbildung 16. Hyperimmunseren von acht Kaninchen

Das jeweils verabreichte Yop ist einzeln als Antigen auf die in Streifen geschnittene Membran gebロットet.

- Blotstreifen 1: Kaninchen 1, immunisiert gegen YopH
- Blotstreifen 2: Kaninchen 2, immunisiert gegen YopM
- Blotstreifen 3: Kaninchen 3, immunisiert gegen LcrV
- Blotstreifen 4: Kaninchen 4, immunisiert gegen YopT
- Blotstreifen 5: Kaninchen 5, immunisiert gegen YopD
- Blotstreifen 6: Kaninchen 6, immunisiert gegen YopN
- Blotstreifen 7: Kaninchen 7, immunisiert gegen YopP
- Blotstreifen 8: Kaninchen 8, immunisiert gegen YopE

4.4 Charakterisierung der systemischen und lokalen Antikörperantwort nach der experimentellen Infektion von Schweinen

4.4.1 Vorversuch

Vor der Durchführung des Infektionsversuchs mit neun Ferkeln wurde in Vorversuchen die generelle Eignung der Yops als Indikatoren der Antikörperantwort gegen eine Yersinien-Infektion in Serum und Darm- bzw. Gelenkflüssigkeit in einem Infektionsversuch mit zwei Ferkeln geprüft.

Dabei lässt sich in der untenstehenden **Abbildung 17** gut erkennen, dass die Antikörperantwort gegen die gezeigten Yops im Serum zu unterschiedlichen Zeitpunkten und unterschiedlich stark einsetzt. Außerdem ließ sich in den Sekreten von Kolon, Duodenum und Ileum sowie in der Synovia ebenfalls eine spezifische Antikörperantwort detektieren. Parallel wurden Schweine mit *Y. enterocolitica* Serovar O:6, einem Stamm ohne Virulenzplasmid, also auch ohne Expression der Yop-Antigene, infiziert. Hier konnte, wie zu erwarten, keine Antikörperantwort gegen Yops detektiert werden.

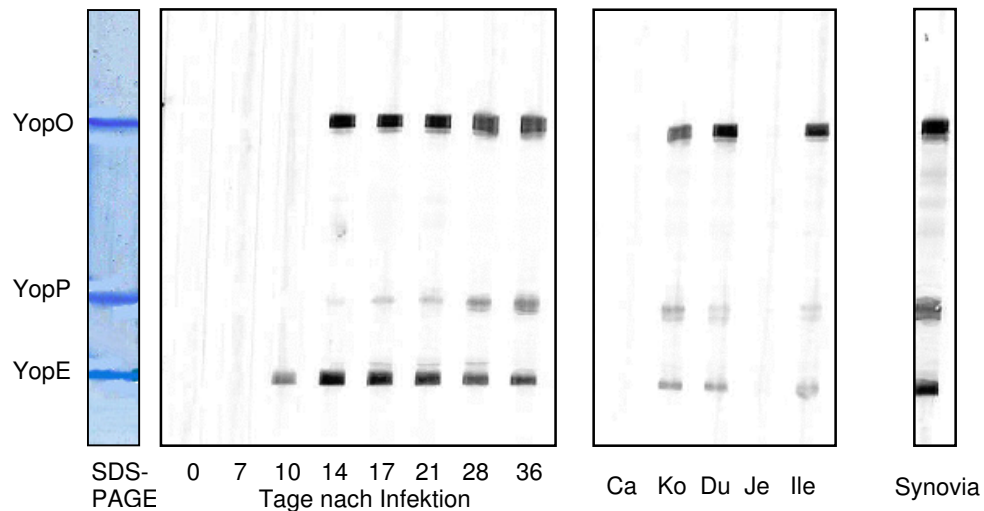


Abbildung 17. Isotypspezifische systemische und lokale IgG-Antikörperantwort eines mit *Y. enterocolitica* Serovar O:3 infizierten Schweines gegen die Antigene YopO, YopP und YopE.

(Abkürzungen: Ca = Cäcum, Ko = Kolon, Du = Duodenum, Je = Jejunum, Ile = Ileum)

Zur Detektion der Anti-*Yersinia* Antikörper wurden Immunoblots mit elektrophoretisch aufgetrennten rekombinanten Yops als Antigen eingesetzt. Das Serum wurde im zeitlichen Verlauf vom Tag der Infektion bis zum Tag der Tötung aufgetragen.

4.4.2 Hauptversuch

Basierend auf den Ergebnissen des Vorversuches konnte die serologische Auswertung von weiteren neun, mit *Y. enterocolitica* infizierten Hybridschweinen erfolgen. In diesem Fall sollte die systemische und lokale spezifische Antikörperantwort gegen *Y. enterocolitica* bei einer größeren Tieranzahl charakterisiert und verglichen werden. Alle gewonnenen Proben wurden auf den hergestellten Blotstreifen isotypspezifisch auf IgG-, IgA- und IgM-Antikörper gegen alle in dieser Arbeit rekombinant produzierten und auflierten Yops untersucht.

4.4.2.1 Isotypspezifische systemische Antikörperantwort – Immunglobulin G

Alle neun Schweine entwickelten im Versuchszeitraum von 33 Tagen eine ausgeprägte und kontinuierlich ansteigende Antikörperantwort gegen einen Großteil der Yop-Proteine. Betrachtet man die Reaktion auf jedes einzelne Yop, so fällt eine unterschiedliche Intensität der Antikörperantwort auf (**Abbildung 18**). Während bei den Proteinen YopH, YopE, LcrV und YopD bei allen Schweinen ein starker Antikörperanstieg zu verzeichnen ist (**Abbildung 18** ab Tag 17 und **Abbildung 19** ab Tag 21), entwickelte nur ein Schwein spezifische Antikörper gegen YopP. Auch gegen YopT ist lediglich bei zwei Schweinen eine schwache Antikörperantwort zu registrieren (**Abbildung 18**). Insgesamt sechs Schweine reagierten mit einer vergleichsweise schwachen Antikörperantwort auf YopN und fünf Schweine auf YopM. Auffällig ist aber, dass bei diesen vier Yops die Antikörperantwort erst zu einem späteren Zeitpunkt, d.h. im letzten Drittel des Versuchszeitraumes einsetzt und somit nicht ausgeschlossen werden kann, dass alle Schweine bei entsprechend längerer Versuchsdauer spezifische

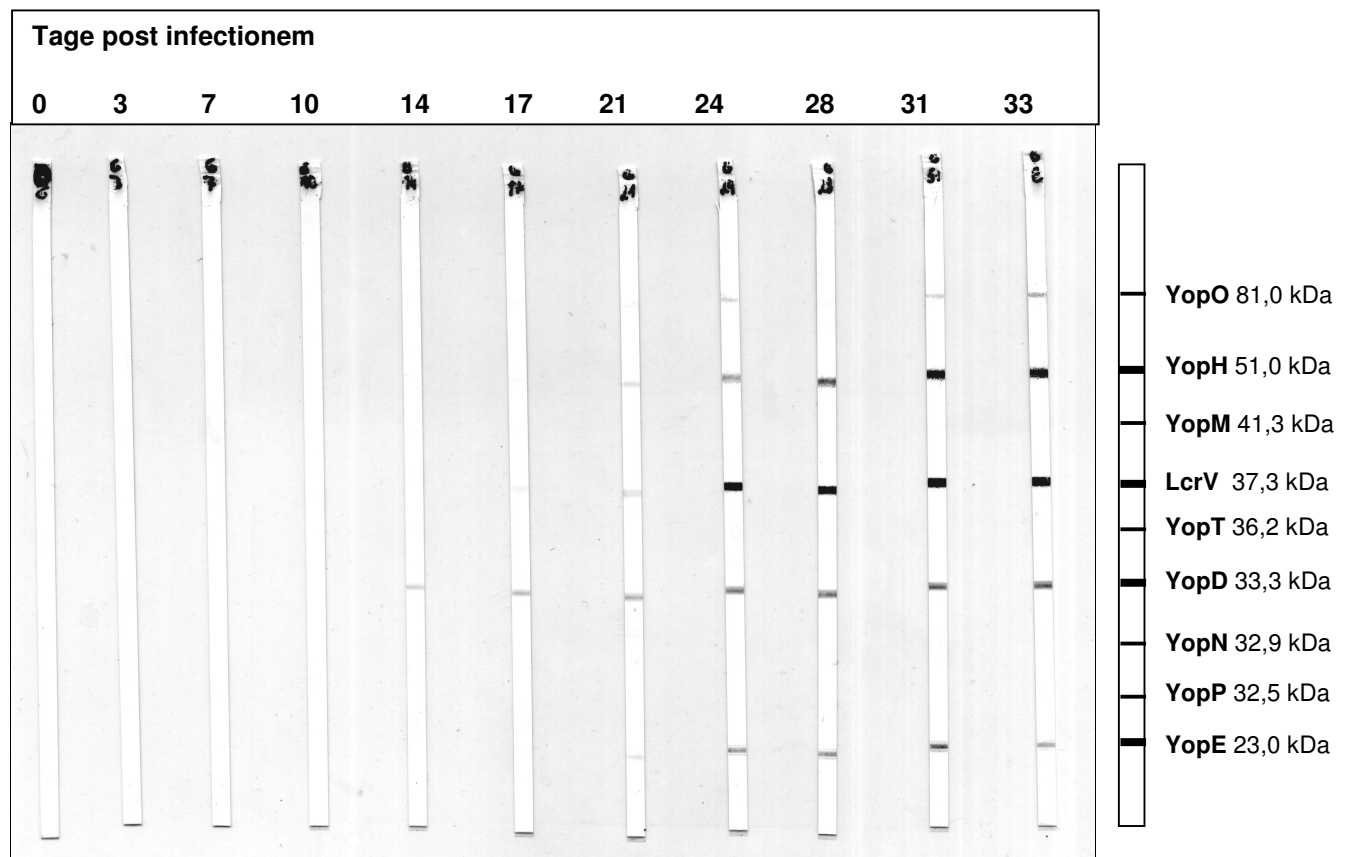


Abbildung 19. Verlauf der isotypspezifischen Antikörperantwort (IgG) im Serum eines experimentell mit *Y. enterocolitica* infizierten Schweines (Sus 852). Es fehlen Antikörper gegen YopM, YopT, YopN und YopP.

Die **Abbildungen 18** und **19** zeigen exemplarisch den Ablauf der Serokonversion im Versuchszeitraum für alle neun Schweine. Es lässt sich demnach festhalten, dass die ersten Antikörper der Immunglobulinklasse G nach ca. zehn Tagen gebildet werden und sich zu diesem Zeitpunkt ausschließlich gegen das Antigen YopD richten. Im weiteren Verlauf werden Antikörper vor allem gegen YopH, LcrV und YopE gebildet, die wie YopD bis zum Ende des Versuches ein starkes Signal im Immunoblot aufweisen. Antikörper gegen YopM, YopN, YopP und YopT lassen sich nicht bei allen Schweinen nachweisen oder spielen in den ersten 33 Tagen einer Infektion eine untergeordnete Rolle in der systemischen Antikörperantwort.

Bei der serologischen Untersuchung der Gruppe nicht infizierter Schweine konnte gegen keines der auflierten Yops eine spezifische Antikörperantwort ermittelt werden.

In der **Abbildung 20** sind Anfangs- und Endseren aller neun infizierten Schweine dargestellt.

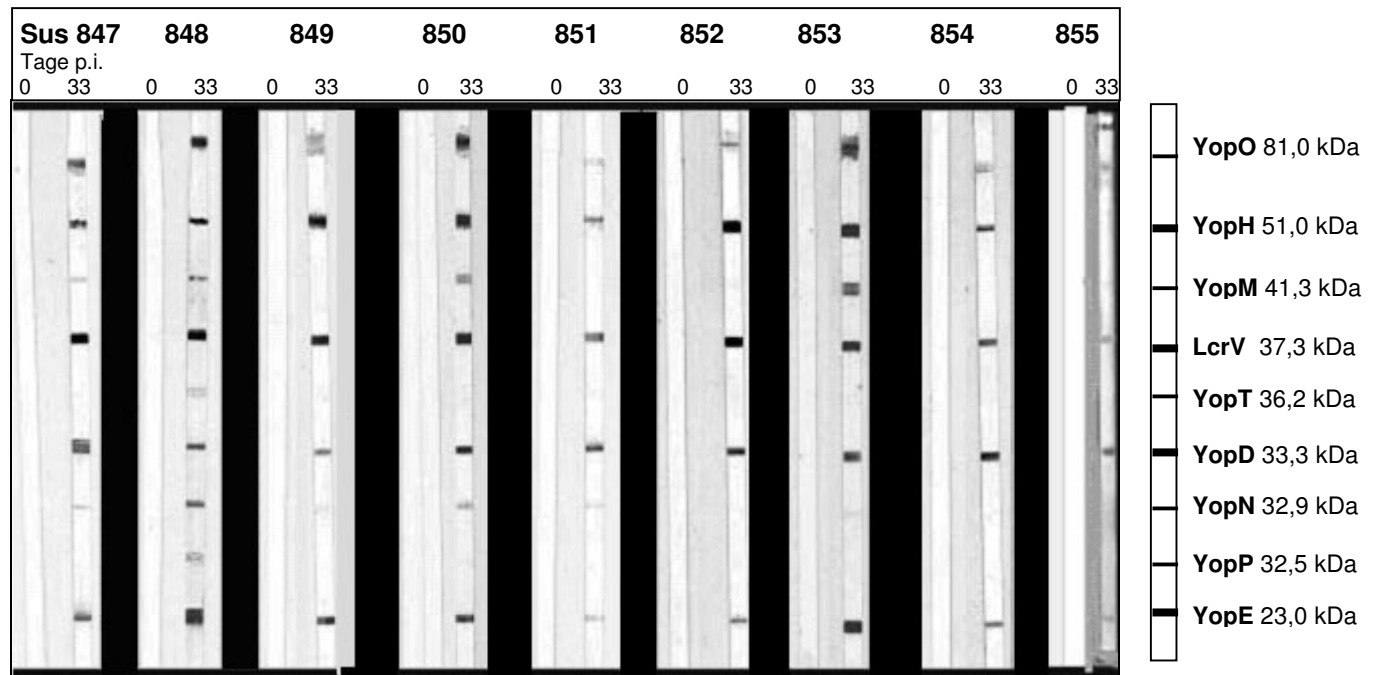


Abbildung 20. Antikörperantwort (IgG) der neun infizierten Schweine 847 bis 855 am Tag 0 und am Tag 33 nach Infektion.

4.4.2.2 Isotypspezifische systemische Antikörperantwort – Immunglobulin A

Mit Hilfe der Teststreifen ließen sich ebenfalls spezifische Immunglobuline der Klasse A (IgA) gegen *Y. enterocolitica* im Serum aller infizierten Schweine nachweisen. Auch hier wurden vor allem Antikörper gegen YopO, YopH, LcrV, YopD und YopE gebildet, die sich aber zeitlich nicht mehr klar zuordnen lassen, sondern deren Auftreten bei den einzelnen Schweinen zwischen Tag 7 und 17 schwankt. Spezifische Antikörper gegen YopM traten bei sieben Schweinen auf, gegen YopN bei fünf Schweinen und gegen YopT und YopP bei vier bzw. zwei Schweinen. Wie auch bei der IgG-Antwort ist die Antikörperantwort gegen diese vier Yops schwächer im Vergleich zu YopO, YopH, LcrV, YopD und YopE. Außerdem trat die spezifische Antikörperantwort ebenfalls eher im letzten Drittel des Versuchszeitraumes auf. Auffällig war zudem, dass bei acht von neun Schweinen die Antikörperantwort gegen einzelne Yops, vor allem YopO, YopD und YopE, am letzten Kontrolltag (Tag 33) schwächer erschien, bei zwei Schweinen war die Antikörperantwort gegen alle Yops vermindert.

Bei der serologischen Untersuchung der Gruppe nicht infizierter Schweine konnte gegen keines der auflinierten Yops eine spezifische Antikörperantwort ermittelt werden.

Abbildung 21 und **22** zeigen exemplarisch die IgA-Antikörperantwort bei zwei der infizierten Schweine. In **Abbildung 21** fällt die Antikörperantwort verhältnismäßig stark aus, außer gegen YopP werden gegen alle Yops Antikörper gebildet.

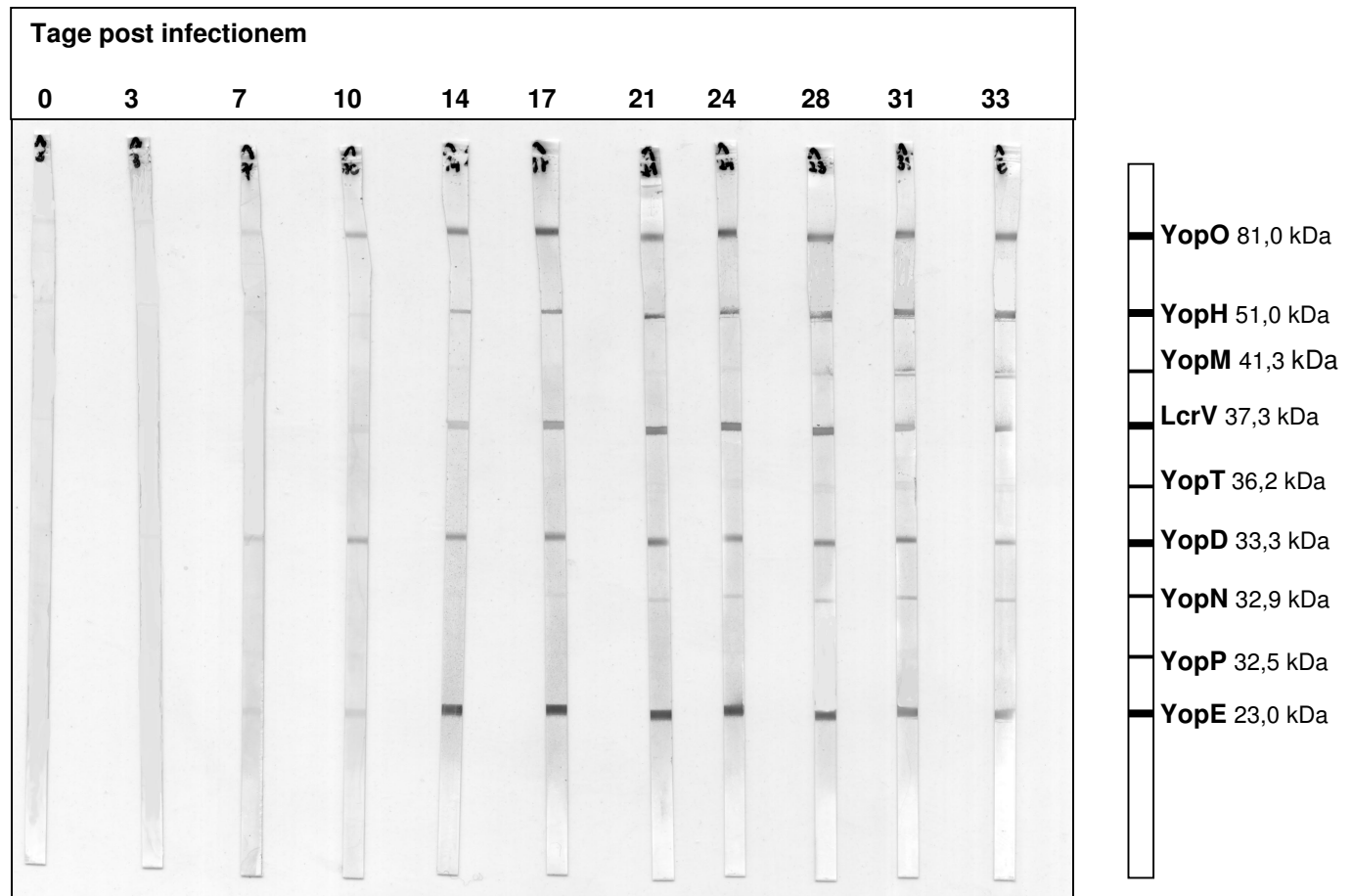


Abbildung 21. Verlauf der spezifischen Antikörperantwort (IgA) im Serum eines experimentell mit *Y. enterocolitica* infizierten Schweines (Sus 848)

Dagegen fällt die Antikörperantwort bei dem Schwein in **Abbildung 22** deutlich schwächer aus, gegen YopM, YopT, YopN und YopP werden keine Antikörper gebildet und die Immunantwort wird zum Ende des Versuchszeitraumes deutlich schwächer.

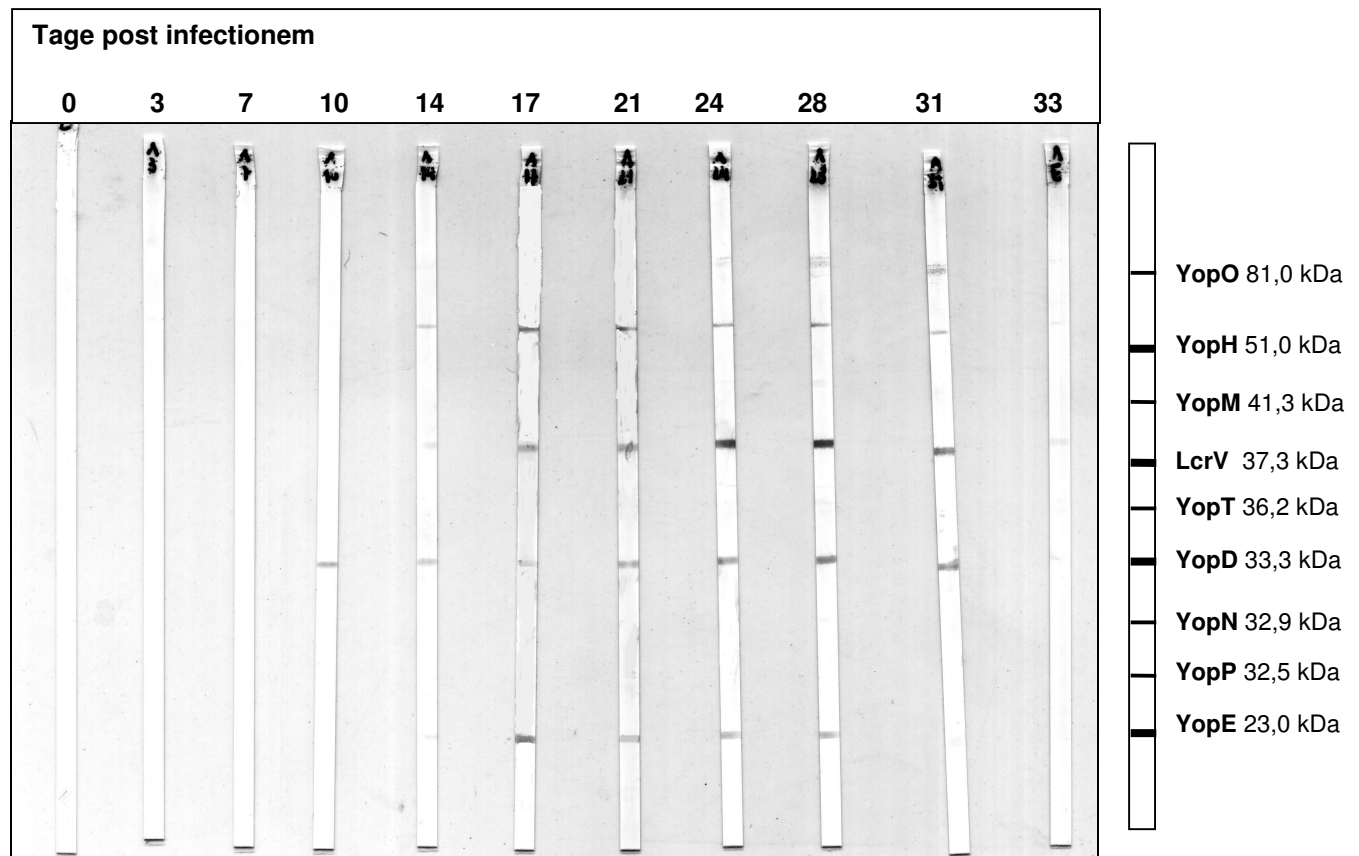


Abbildung 22. Verlauf der spezifischen Antikörperantwort (IgA) im Serum eines experimentell mit *Y. enterocolitica* infizierten Schweines (Sus 854). Deutliche Abschwächung der Antikörperantwort am Ende des Versuchszeitraumes.

4.4.2.3 Immunglobulin M

Eine isotypspezifische IgM-Antikörperantwort gegen *Y. enterocolitica* war zwar visuell beurteilbar, ließ sich aber mit dem vorhandenen 2. Antikörper (Anti-IgM-Konjugat) und der TMB-Farbreaktion nur schlecht darstellen. In fünf getesteten Seren am Tag der Infektion war bereits eine schwache und vermutlich unspezifische Antigen-Antikörper-Reaktion zu erkennen, viele Teststreifen wurden durch das TMB vollständig eingefärbt und oft zeigten sich inverse Banden. Da nur eine begrenzte Anzahl an Blotstreifen zur Verfügung stand, wurde auf weitere Detektionsversuche vorerst verzichtet und die Auswertung der lokalen IgG- und IgA-Antikörperantwort vorangestellt.



Abbildung 23. Verlauf der isotypspezifischen Antikörperantwort (IgM) im Serum eines experimentell mit *Y. enterocolitica* infizierten Schweines (Sus 851). Deutliche Abschwächung der Antikörperantwort am Ende des Versuchszeitraumes.

4.4.2.4 Isotypspezifische lokale Antikörperantwort –Immunglobulin G

Für die Ermittlung der lokalen Antikörperantwort wurde bei der Tötung der Schweine, wie unter **Punkt 3.4.6** beschrieben, Tränenflüssigkeit, Speichel, Synovia sowie Darmsekrete von Jejunum, Ileum, Cäcum und Kolon gewonnen. Bei allen Schweinen wurde eine starke spezifische IgG-Antikörperantwort in der Gelenkflüssigkeit und den einzelnen Darmsekreten gegen *Y. enterocolitica* detektiert, während in Speichel und Tränenflüssigkeit keine spezifische IgG-Antwort gegen *Y. enterocolitica* zu registrieren war (**Abbildung 24**). Obwohl die Synovia mit einem Verhältnis von 1:10 doppelt so hoch verdünnt wurde wie die übrigen Proben, war die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion gegen *Y. enterocolitica* hier stets am stärksten, nahezu alle Yop-Antigene, außer gelegentlich YopT und YopP, wurden mit intensiv gefärbten Banden erkannt. Bei den Darmsekreten fiel die Antikörperantwort in Cäcum und Kolon stets etwas stärker aus als in Jejunum und Ileum.

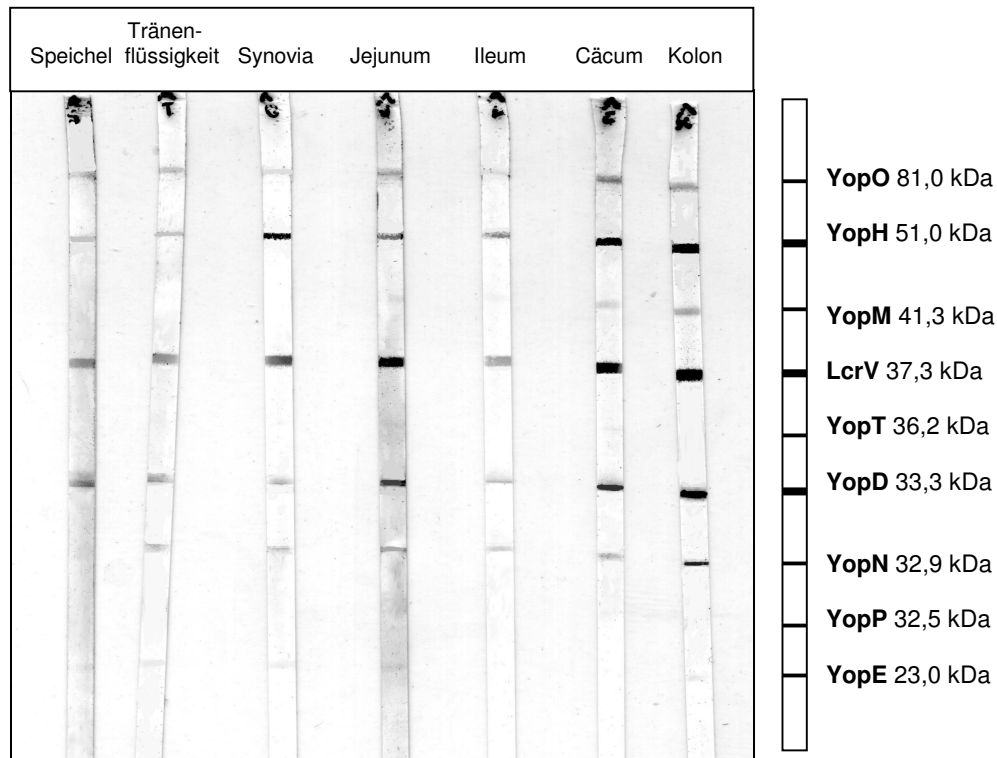


Abbildung 26. Lokale Antikörperantwort (IgA) in den jeweiligen Geweben bzw. Körperflüssigkeiten eines experimentell mit *Y. enterocolitica* infizierten Schweines (Sus 847). Status 33 Tage nach der Infektion, am Ende des Versuchszeitraumes.

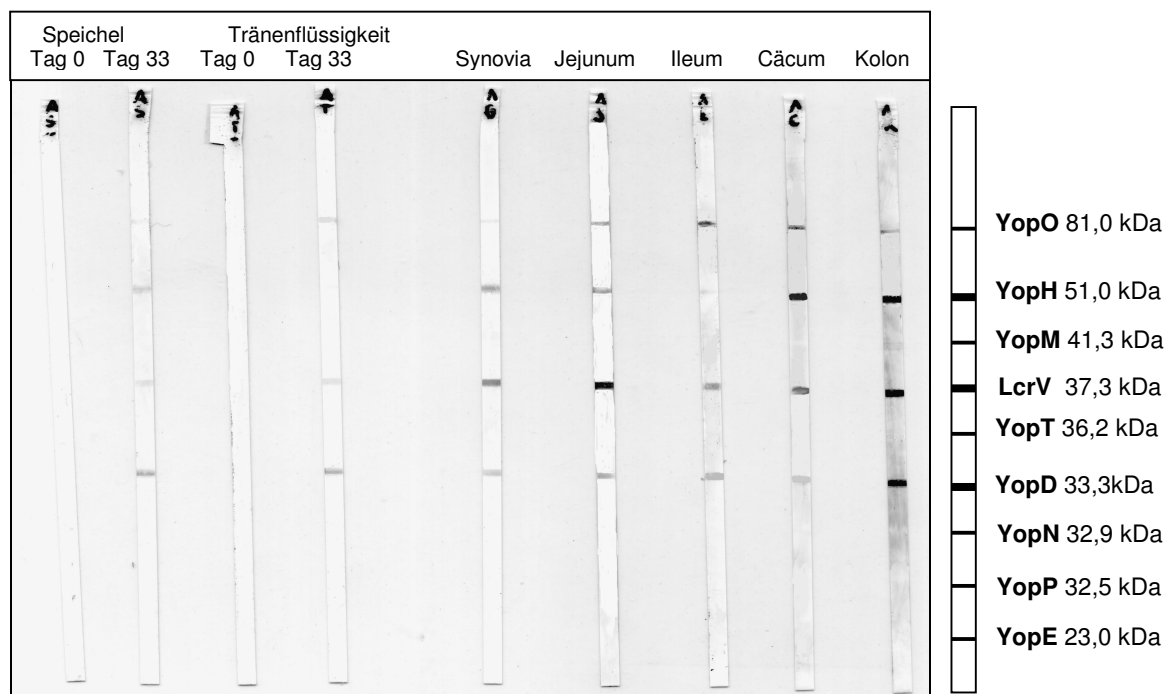


Abbildung 27. Lokale Antikörperantwort (IgA) in den jeweiligen Geweben bzw. Körperflüssigkeiten eines experimentell mit *Y. enterocolitica* infizierten Schweines (Sus 852). Status 33 Tage nach der Infektion. Vergleichsweise ist für Speichel und Tränenflüssigkeit auch der Antikörperstatus am Tag Null, d.h. am Tag der Infektion, dargestellt.

Zusammenfassend fiel bei der Untersuchung der systemischen und lokalen Antikörperantwort gegen *Y. enterocolitica* auf, dass im Versuchszeitraum, der die frühe Phase des Immungeschehens widerspiegelt, einige Yops eine stärkere Antikörperantwort induzieren. Es handelte sich dabei vor allem um die Antigene YopH, LcrV und YopD sowie in etwas geringerem Maße YopO und YopE. Diese Antigene riefen systemisch und lokal ohne bedeutende Abweichungen sowohl eine starke spezifische IgA- als auch IgG-Antwort hervor. Dagegen fiel die Antikörperantwort gegen YopM, YopN, YopP und YopT generell schwächer aus oder war nicht vorhanden.

Bei der Untersuchung der Verlaufsseren unterschieden sich die beiden Isotypen nur in der zeitlichen Abfolge der Immunreaktionen auf die einzelnen Yops. Während die ersten IgG-Antikörper bei fast allen Schweinen am zehnten Tag nach der Infektion nachweisbar waren und sich ausschließlich gegen YopD richteten, konnte der frühesten IgA-Antwort kein so eindeutiger Zeitpunkt und kein dominantes Yop zugeordnet werden. Bei sechs von neun Schweinen schien die Intensität der Antikörperreaktion an den letzten Tagen abzunehmen, dagegen zeigte die IgG-Reaktion bis zum Ende des Versuchszeitraumes einen stetigen Anstieg.

Bei der Untersuchung der lokalen Abwehr fiel die unerwartet starke IgG-Reaktion vor allem in den Darmsekreten auf, im Speichel und in der Tränenflüssigkeit dagegen waren keine Antikörper vom Typ IgG gegen Yops nachweisbar. Mit der gleichen Verdünnung konnten darin allerdings Antikörper vom Typ IgA, vorwiegend gegen YopH, LcrV und YopD gerichtet, ermittelt werden. Auch in den Darmsekreten ließ sich spezifisches IgA ohne wesentliche Unterschiede zum IgG nachweisen.

Keines der untersuchten Seren und Sekrete der negativen, nicht infizierten Kontrolltiere erbrachte eine sichtbare Antikörperantwort auf den Blotstreifen.

Das im Verlauf dieser Arbeit entwickelte Nachweissystem in Form von Blotstreifen ist somit aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sehr gut geeignet, um anhand der Yop-spezifischen Antikörperantwort serologisch positive Schweine zu ermitteln und den zeitlichen Verlauf dieser Antwort zu dokumentieren.

Abbildung 28 zeigt zusammenfassend die Serokonversion der Schweine im zeitlichen Verlauf geordnet nach der Intensität der Antikörperantwort gegen die einzelnen Yops.

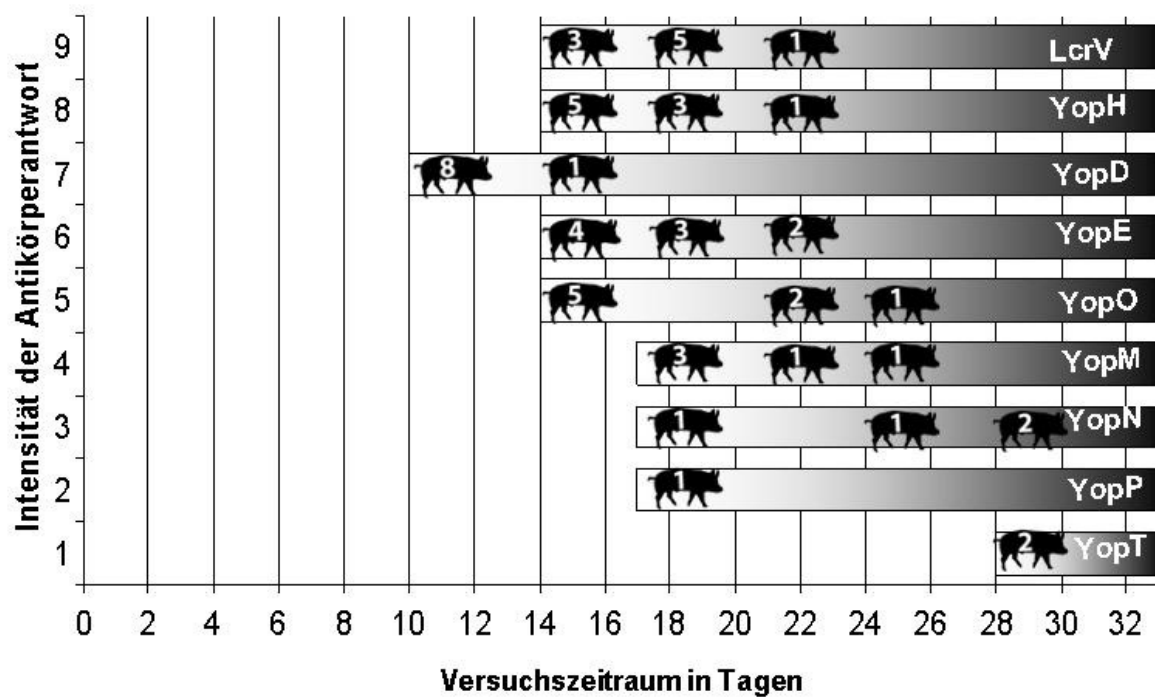


Abbildung 28. Kinetik und Intensität der Antikörperantwort (IgG) gegen *Y. enterocolitica*



= Anzahl der Schweine, die eine Antikörperantwort zeigen

Die Yops sind geordnet nach der Intensität der jeweiligen Antikörperantwort, LcrV zum Beispiel rief bei allen Schweinen eine starke immunologische Reaktion hervor, YopT dagegen nur eine schwache. Die früheste Bildung von IgG-Antikörpern konnte gegen YopD bei acht Schweinen am zehnten Tag ermittelt werden.

5 DISKUSSION

Das im Verlauf dieser Arbeit entwickelte Immuno-Blot-Verfahren ist in der Lage, serovarübergreifend Antikörper gegen Yersinien mit hoher Spezifität zu erkennen. Enterale, bakterielle Infektionen des Menschen werden vor allem durch *Campylobacter*, *Salmonella* und *Yersinia* verursacht. Diese Erreger gelten als besonders problematisch, da Infektionen beim Trägartier, so auch beim Schwein, in der Regel subklinisch verlaufen und somit keine gravierenden Gesundheitsprobleme im Bestand erkennbar sind. Vor allem Yersinien, mit dem Schwein als persistent infiziertem Reserviertier, stellen eine potentielle Infektionsquelle für den Menschen dar. Die Verhütung lebensmittelbedingter Infektionskrankheiten sollte sich auf alle Stufen der Nahrungskette vom Stall bis zum Teller („from the stable to the table“) des Verbrauchers erstrecken (Farm to Fork-Konzept). Dafür muss mehr Wissen über die Situation in Schweinebeständen bezüglich des Erregers *Y. enterocolitica* gewonnen werden. Das Testsystem wurde in einem experimentellen Tierversuch mit dem Reserviertier Schwein evaluiert und validiert, es eignet sich besonders zur Ermittlung der Seroprävalenz und zur weiteren Bestandsüberwachung. Der Vorteil des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Testsystems liegt in der Verwendung rekombinanter Antigene, deren Vorkommen auf dem *Yersinia*-eigenen Virulenzplasmid Kreuzreaktionen mit anderen Enterobakterien und auch Brucellen ausschließt, wie sie bei der Verwendung von bakteriellem LPS sonst testimmanent auftreten (HEESEMANN et al. 1987, HEESEMANN u. KARCH 1995). Darauf aufbauend beschreibt diese Arbeit erstmalig den zeitlichen Verlauf der Antikörperbildung gegen die wichtigsten *Yersinia*-Antigene beim Schwein.

Diagnostisch gesehen bietet die einfache und schnelle Handhabung der Teststreifen weitere Vorteile. Bakterielle Untersuchungen von Kotproben erwiesen sich, wie auch bei Salmonellen, als problematisch und zum Teil auch als arbeits- und zeitaufwändig. Die Anzucht des Erregers ist zwar in den meisten Fällen einfach möglich, da die Erreger aber nur intermittierend ausgeschieden werden, ist diese Methode für eine Diagnose als unsicher zu werten. Das negative Ergebnis einer einmaligen Kotuntersuchung rechtfertigt also weder für das Einzeltier noch für den Bestand die Bewertung als „Yersinien-frei“. Mehrmalige Kotuntersuchungen, denen zudem ein Anreicherungsverfahren vorausgehen muss, sind demnach unerlässlich. Dies ist mitunter mit einem enormen Kosten- und Zeitaufwand verbunden. Erschwerend kommt hinzu, dass die klinisch unauffälligen Schweine keine Verdachtsdiagnosen zulassen. In diesem Zusammenhang sind indirekte Nachweissysteme wie die Möglichkeit der serologischen Überprüfung mittels Western-Blotstreifen oder ELISA von großer Bedeutung. Der Nachweis von Antikörpern erlaubt den Rückschluss auf eine stattgefundene Infektion mit Yersinien. Ob das Tier zum Zeitpunkt der Untersuchung noch Träger des Erregers ist, kann aufgrund des möglichen Fortbestehens erhöhter Antikörpertiter nicht bewiesen werden. Gleichwohl hat sich auch bei der Salmonellenbekämpfung und –Überwachung die serologische Methodik bereits etabliert und dient als Grundlage für eine Bewertung der Bestandssituation.

5.1 Herstellung der rekombinanten Antigene

Die Entwicklung des angestrebten serologischen Testsystems setzte die Herstellung und Verwendung hochgereinigter, spezifischer Antigene voraus. Als Targetproteine wurden die *Yersinia*-spezifischen, hochimmunogenen Yop-Proteine gewählt.

Eine Aufreinigung natürlich exprimierter Yops aus *Yersinia* zu diagnostischen Zwecken stellte sich als ungeeignet heraus, da im natürlichen System die Proteine in unterschiedlichen Mengen von *Yersinia* sezerniert werden und nur Bestandteil eines hoch komplexen Proteingemisches sind (HAKANSSON et al. 1996, IRIARTE u. CORNELIS 1998). Frühere Immuno-Blots wurden mit elektrophoretisch aufgetrennten natürlich exprimierten Yops hergestellt (HEESEMAN 1990, HEESEMAN et al. 1987, STAHLBERG et al. 1987), wobei die Antikörperantwort bei den verschiedenen Untersuchungen nahezu gleich ausfiel und nur die stärker sezernierten Yops mit einer größeren Antigenmenge durch deutliche Banden detektiert werden konnten. Da die Überprüfung der Immunogenität aller sezernierten Yops aber ein Ziel der Untersuchung war, sollte das hergestellte Testsystem auf rekombinanten Yops basieren. Um hochgereinigte Yops herzustellen, die dann in genau definierten Mengen zur Entwicklung der serologischen Testsysteme eingesetzt werden konnten, wurden alle Yops rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt. Der wesentliche Vorteil der rekombinant hergestellten Proteine besteht in der Möglichkeit der getrennten Auflinierung einzelner Yops mittels Sprühverfahren wodurch die gewünschten Aussagen über die Immunogenität der verschiedenen Yops gewonnen werden können. Durch dieses Verfahren war es möglich, ein umfassendes, differenziertes Bild der Antikörperantwort mit *Yersinia enterocolitica* infizierter Schweine in verschiedenen Stadien der Infektion sowohl im Serum als auch in den verschiedenen Körperflüssigkeiten zu untersuchen.

5.1.1 Konstruktion geeigneter Oligonukleotide für die PCR

Jedes Effektor-Yop wirkt nach der Injektion in die Wirtszelle über spezifische molekulare Pathomechanismen auf zelluläre Signale der Wirtszelle. Translokations-Yops sorgen für den Transfer in die Zielzelle, wieder andere Yops scheinen am Öffnen und Schließen des entstandenen Sekretionskanals beteiligt zu sein. Welche Genabschnitte für die Funktionen der Yops verantwortlich sind oder wie einzelne Yops genau auf den Organismus wirken, konnte bereits in einer Vielzahl von Arbeiten mit Deletionsmutanten auch in Tierversuchen eruiert werden (LOGSDON u. MECSAS 2003, 2006; TRÜLZSCH et al. 2004). Um aber eine repräsentative Aussage über die Modulation der Antikörperantwort durch die einzelnen Yops zu gewinnen, sollte versucht werden, eine möglichst große Anzahl verschiedener Yop-Proteine rekombinant durch Klonierung und Expression ihrer Gene vollständig herzustellen. In dieser Arbeit ist es gelungen, alle sechs Effektor-Yops, das invasive Membranprotein YadA, zwei ausgewählte Translokatoren (YopD und LcrV) sowie das Regulator-Gen YopN zu klonieren und deren Expression in *E. coli* zu induzieren.

Da jeweils das komplette Virulenzgen amplifiziert werden sollte, um die Expression des vollständigen Proteins zu erhalten, basierte die Konstruktion der Oligonukleotidpaare auf der Basenabfolge der terminalen 5'- und 3'-Enden des jeweiligen Zielgens. Zusätzlich zu der 19 bis 23 Basen umfassenden Yop-spezifischen Sequenz beinhalteten die Primerkonstrukte vor dem Startcodon geeignete Restriktionsschnittstellen, um die Klonierung der PCR-Produkte in einen geeigneten Vektor zu ermöglichen. Viele Restriktionsenzyme schneiden effizienter in der Mitte eines DNA-Fragmentes als an seinen Enden, weil sie für ihre volle Aktivität eine gewisse Anzahl von Basen 5'- und 3'-seitig von der Schnittstelle benötigen. Normalerweise reichen dafür ein bis drei Basen, doch es stellte sich heraus, dass den Primern für eine effiziente Klonierung mindestens vier bis fünf Nucleotide zusätzlich zur Erkennungssequenz des jeweiligen Restriktionsenzym angehängt werden mussten, so dass sich die Gesamtlänge der Primer auf 30 bis 34 Basen belief.

Um eine Expression der Yop-Gene zu gewährleisten, war es wichtig, die Oligonukleotide so zu konzipieren, dass sich im gewählten Expressionssystem nach der Ligation ein offener Leserahmen für das jeweilige Yop-Protein ergab (in frame-Klonierung). Je nachdem welcher Vektor eingesetzt wurde, mussten zwischen Schnittstelle und Startcodon des Gens eine (pRSET C-Vektor) oder keine (pRSET A-Vektor) Base hinzugefügt werden, um eine korrekte Ablesung der Basen-Triplets zu garantieren.

Generell gelang die Amplifizierung der Gene ausgehend vom isolierten Plasmid als Template-DNA besser als mit DNA eines Gesamtzelllysates. Wie oftmals beschrieben (SAMBROOK et al. 1989), sorgte auch hier die komplexere und verunreinigte DNA für Artefakte, während die reine Plasmid-DNA qualitativ bessere PCR-Produkte lieferte.

5.1.2 Möglichkeit der Differenzierung pathogener Yersinien-Stämme durch YadA

Das *yadA*-Gen weist sowohl in verschiedenen Serovaren von *Y. enterocolitica* als auch in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* unterschiedliche Anzahlen von Basenpaaren auf (SKURNIK u. WOLF-WATZ 1989, ROSQVIST et al. 1988). Während *yadA* auf den Plasmiden der in Europa dominierenden *Y. enterocolitica*-Serovare O:3 und O:9 mit 1368 bzw. 1365 bp nahezu gleich groß ist, zeigt *yadA* auf dem Virulenzplasmid des hochpathogenen Serovares O:8 eine Länge von 1269 bp. Auf dem Virulenzplasmid YPIII von *Y. pseudotuberculosis* dagegen umfasst das *YadA*-Gen 1305 bp. Bei *Y. pestis* wird das Gen aufgrund einer Mutation (Verschiebung im Leserahmen) nicht exprimiert und ist mit 936 bp stark verkürzt, kann aber auch bei den Stämmen KIM5 und Orientalis die gleiche Länge wie *Y. pseudotuberculosis* aufweisen. Bereits in einem 1%igen DNA-Agarosegel waren die Unterschiede in der Fragmentlänge von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* klar erkennbar, womit sich die Frage stellt, ob eine Differenzierung auch einzelner Serogruppen durch die Amplifizierung des *yadA*-Gens möglich wäre. Weitere Recherchen zu den Sequenzlängen für *YadA* in der Genbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) ergaben allerdings zum Teil nur einen Unterschied von 30 bp zwischen den Spezies, was auf einem Agarosegel nur mit großer

Erfahrung zweifelsfrei unterscheidbar wäre. Zudem dürfte die Amplifizierung des vollständigen langen *yadA*-Gens mit den genannten Primern aus biologischem Material zu störanfällig sein. KAPPERUD et al. (1993) etablierten bereits eine Methode um anhand des *yadA*-Gens pathogene *Y. enterocolitica*-Isolate von *Y. pseudotuberculosis*-Isolaten in Lebensmitteln, klinischem Material und Umweltproben abzugrenzen. Allerdings handelt es sich dabei um eine relativ aufwändige „Nested“-PCR, der zudem eine Separation mit immunomagnetischen Beads vorausgeht. Auch FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999, 2000b) nutzten das ausschließlich in pathogenen Serovaren vorkommende *YadA*-Gen nur in einer „Nested“-PCR.

Bei einem Vergleich (alignment) der *yadA*-Sequenzen befindet sich der Abschnitt mit den unterschiedlichen bzw. fehlenden Basenpaaren stets ungefähr an der gleichen Stelle. Würde man die *yadA*-Primer so konstruieren, dass nur das kürzere Stück mit den Sequenzunterschieden, also der Genlocus mit den fehlenden Basenpaaren, mit eingeschlossen ist, würden die unterschiedlichen Längen des amplifizierten Produkts in einem Agarosegel viel deutlicher ausfallen und somit vielleicht eine Unterscheidung der Spezies und eventuell auch der Serovarzugehörigkeit möglich machen. Problematisch ist aber der mögliche Verlust des Virulenzplasmids durch die Kultivierung und die daraus resultierenden falsch-negativen Ergebnisse (WREN u. TABAQCHALI 1990). Daher werden *yadA*-Primer oder auch Primer für andere plasmoidale Gene häufig mit Primern für chromosomale Gene kombiniert (NAKAJIMA et al. 1992, BLAIS u. PHILLIPPE 1995).

5.1.3 Expressionssystem - Kombination von Vektor und Expressionsstamm

Für die Klonierung der PCR-Produkte mit dem Ziel der effizienten Expression der rekombinanten Proteine spielte die Wahl des geeigneten Vektors und der Wirtszellen eine wichtige Rolle. Die Klonierungsstrategie beinhaltet eine spätere Reinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie. Die rekombinant hergestellten Proteine sollten dafür um eine zusätzliche Polyhistidin-Sequenz, dem in der Proteinreinigung bewährten Histidin-Tag, ergänzt werden (Histidin-Fusionsproteine). Die in der Arbeit verwendeten Vektorsysteme pQE 32 und pRSET besitzen beide eine 6x His-Tag-Sequenz, die dem stromabwärts eingefügten Insert vorangestellt wird und somit ein N-terminales His-Tag-Fusionspeptid generiert. Zum Vektorplasmid kompatible Expressionszellen wurden nach Transformationseffizienz und genetischen Markern ausgesucht. Der *E. coli* Stamm DH5 α ist der am häufigsten benutzte Klonierungsstamm mit den Mutationen *recA1* und *endA1*. *RecA1*-Genotypen stabilisieren das eingefügte Insert und verhindern unerwünschte Rekombinationen zwischen Insert und Wirtszelle, *endA1*-Genotypen sind Endonuclease-defizient und ermöglichen durch unkomplizierte DNA-Minipräparationen mit klar definierten Banden im Agarosegel ein schnelles Screening der Transformationskolonien. Obwohl in einem der Arbeit vorausgehenden Vorversuch das Gen *yopO* bereits erfolgreich mit der Vektor/Wirt-Kombination pQE 32/DH5 α exprimiert werden konnte, ließ sich bei den ersten drei klonierten Genen *yadA*, *yopE* und *yopT* trotz

positiver, d.h. Insert-tragender Klone, keine Expression induzieren. Parallel zu DH5 α wurde der *E. coli*-Stamm XL1 Blue als Wirtssystem eingesetzt, ebenfalls ein häufig verwendeter Expressionsstamm, der durch partielle Deletion seines *lacZ*- Genes über Zugabe von IPTG die Blau-Weiß-Selektion (α -Komplementation) der ausplattierten Kolonien ermöglicht. Auch bei diesem Stamm ließen sich im Agarosegel Insert-tragende Klone identifizieren, ohne dass eine sichtbare Expression des rekombinanten Proteins erzielt wurde. Für dieses Phänomen können eine Reihe unterschiedlicher Gründe verantwortlich sein. Aus der Molekularbiologie bekannte Gründe (SAMBROOK et al. 1989) sind unter anderem eine ungenügende Transkription/Translation, post-translationale Modifizierungen oder Degradierung des Proteins sowie Instabilität des Vektor-Insertkonstruktes oder Mutationen/Rekombinationen in der kodierenden Sequenz des zu exprimierenden Gens. Eine Überprüfung, einschließlich der Sequenzierung der Insert-tragenden Klone, gab jedoch keinen Hinweis darauf, weshalb eine effiziente Expression der Proteine nicht gelang.

Offenbar spielte die Toxizität der zu exprimierenden Gene hier eine große Rolle. Für den Wirt weniger toxische Proteine können problemlos in vielfach genutzte, robuste Expressionssysteme integriert werden. Auch LcrV konnte bereits, ähnlich wie YopO, mit dem System pQE30/*E. coli* M15 exprimiert werden (REITHMEIER-ROST 2005). Da gerade die Proteine YopE und YopT in vivo durch die Zerstörung des Aktinskeletts besonders toxisch sind, kamen neue Vektoren mit einem anderen Induktionsprinzip und dafür geeignete Expressionsstämme zum Einsatz. Der Vektor pRSET, ein pET-Derivat, gilt in Verbindung mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) als „high-level“-Expressionssystem, das über den T7 Promoter des Vektors in Verbindung mit der spezifischen T7 RNA-Polymerase des Wirtsstammes reguliert wird (KROLL et al. 1993). Der genetische Marker *ompT* charakterisiert das Fehlen einer Protease, wodurch der vorzeitige Abbau synthetisierter Proteine vermieden wird. Um die Vorteile beider Stämme auszunutzen, wurden die Plasmide erst in DH5 α transformiert und die in diesem System leichter zu identifizierenden Insert-tragenden Klone anschließend zur Expression in die DE3- Zelllinie eingebracht. Auf diese Weise konnte als erstes Protein das Membranprotein YadA exprimiert werden. Eine auffallende Besonderheit war allerdings die ausschließliche Expression von YadA auf festem Medium, der LB-Amp-Agarplatte, wohingegen in Flüssigkultur eine Zelllyse zu beobachten war. Dieses Phänomen trat auch im nicht induzierten Zustand auf und weist somit auf eine vorhandene Hintergrundexpression des Proteins hin (die sogenannte „leaky expression“). Das Absterben der Zellen in Flüssigmedium und das Überleben auf festem Medium wird vermutlich durch eine Destabilisierung der Zellmembran der Wirtszellen verursacht. Werden Membranproteine in BL21(DE3)-Wirtszellen zur Expression gebracht, kann es zum Absterben der Zellkultur kommen (MIROUX u. WALKER 1996). Im natürlichen Wirt unterliegt die Expression des integrativen Zellmembran-Proteins YadA einer strengen Genregulation, so dass es zu keiner Zellschädigung kommt. Im BL21(DE3)-Stamm jedoch genügt die vorhandene Hintergrundexpression (DUBENDORFF u. STUDIER 1991), um ein für *E. coli* toxisches YadA-Protein zu generieren und so

vermutlich die Destabilisierung der Zellmembran zu bewirken. In dem Fall sterben die Zellen der Flüssigkultur ab, da sie dort stärkeren Scherkräften ausgesetzt sind.

Auf Basis dieser Erfahrungen und aus der Überlegung heraus, dass auch andere Yops, wenn sie überexprimiert werden, toxisch für die Zellen sind, wurde für alle weiteren Expressionen die Zelllinie BL21(DE3)pLysS verwendet, die durch eine Bindung von T7 Lysozym an die T7-Polymerase die Hintergrundexpression nahezu vollständig verhindert (STUDIER 1991). Bei der Untersuchung des YopE-Chaperons SycE konnten CHENG und SCHNEEWIND (1999) bereits auf diese Weise das toxische YopE im pET/BL21(DE3)pLysS-System exprimieren. Auch ANDREWS et al. (1999) wendeten diese Vektor/Wirt-Kombination bei der Klonierung und Expression einiger Yops von *Y. pestis* an. Einen weiteren Vorteil bietet die vereinfachte Lyse dieser Zellen für die spätere Reinigung aufgrund der Spaltung einer spezifischen Bindung in der Zellwand. Mit der Vektor/Wirt-Kombination pRSET/BL21(DE3)pLysS konnten im weiteren Verlauf alle Yops exprimiert werden.

Die BL21(DE3)pLysS-Zellen haben allerdings den Nachteil, Proteine nur in geringeren Mengen als in den effizienteren BL21(DE3) zu produzieren. Um BL21(DE3) weiterhin nutzen zu können, entwickelten PAN und MALCOLM (2000) Protokolle zur Vermeidung der Hintergrundexpression. Desweiteren schlugen DUMON-SEIGNOVERT et al. (2004) die Verwendung zweier DE3-Mutanten, C41 und C43, zur erfolgreichen Expression toxischer Proteine in großen Mengen vor. Beide Vorgehensweisen erschienen jedoch zu aufwändig, außerdem war die jeweils exprimierte Proteinmenge für die weiteren Arbeiten während der Dissertation ausreichend.

5.1.4 Optimierung der Expression

Die Ermittlung der idealen Expressionsbedingungen war nicht nur wichtig für eine möglichst hohe Ausbeute an rekombinantem Protein, sondern trug auch entscheidend zur späteren Reinheit des Proteins bei. Je intensiver das „Fremdprotein“ vom Wirtstamm produziert wurde, desto mehr trat die Bildung *E. coli*-eigener Proteine in den Hintergrund. Dadurch vereinfachte sich die Reinigung, da weniger *E. coli*-Proteine um freie Bindungsstellen an der Nickel-Matrix konkurrierten und so eine eventuelle Verunreinigung der rekombinanten Yops so gering wie möglich gehalten werden konnte. Vorhandene Kontaminationen wurden später mit Hilfe einer *E. coli*-Affinitätsmatrix entfernt (**Abbildung 14**).

Ein wesentliches Kriterium für optimale Expression stellte die Konzentration an IPTG und vor allem die Dauer der Induktion dar (DONOVAN et al. 1996). Nachdem einige Protokollpunkte wie Schüttlerfrequenz, Kulturvolumen oder geeignete OD zur Induktion standardisiert werden konnten, galten für die einzelnen Yops recht unterschiedliche Induktionszeiten (**Tabelle 8**), deren Nichteinhaltung eine geringere Ausbeute an Protein zur Folge hatte. Besonders deutlich wurde dies bei der Herstellung von YopD, einem Translokator-Yop mit hydrophoben Domänen. Hier war bereits 1 bis maximal 2 h nach Zugabe des Expressions-einleitenden IPTGs das Optimum der

Proteinproduktion erreicht, eine längere Induktionszeit resultierte im völligen Abbau des Proteins. Bei anderen Proteinen wie YopM und YopE erschien eher die Toxizität als begrenzender Faktor, da bei längerer Kultivierung ein Großteil der *E. coli*-Bakterien in der LB-Amp-Lösung abstarb und sich am Boden des Kolbens als verklumpte Zellmasse sammelte. Proteine wie YopP und YopT dagegen, waren nach vier Stunden Induktion nur in verschwindend geringen Mengen vorhanden, eine wesentliche höhere Ausbeute ließ sich hier nach einer Induktion über Nacht erzielen. Bei der Verwendung anderer *E. coli*-Stämme werden aber gegebenenfalls längere Induktionszeiten benötigt. REITHMEIER-ROST (2005) induzierte für die Expression von LcrV einen *E. coli* M15 Stamm 16 Stunden lang, allerdings ist hier möglicherweise keine vorherige Optimierung erfolgt. FIELDS und STRALEY (1999) exprimierten LcrV in einem DH5 α -Stamm innerhalb von 3 Stunden.

5.1.5 Reinigung der rekombinanten Proteine

Die Lyse der Wirtszellen und die anschließende Reinigung von His-Tag-Fusionsproteinen können grundsätzlich unter nativen oder denaturierenden Konditionen erfolgen. Die Entscheidung richtet sich dabei nach Lokalisation und Löslichkeit des Fremdproteins in der Wirtszelle, der Zugänglichkeit bzw. Exponiertheit des 6xHis-Tag und vor allem nach der Frage, ob die biologische Aktivität des gewünschten Proteins erhalten bleiben soll. Da die Proteine als reine Antigene zur Diagnostik eingesetzt werden sollten und erste Versuche unter nativen Bedingungen keine Ergebnisse brachten, wurde die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Zum einen werden mit 6 M GuHCL oder 8 M Urea unlösliche Proteinaggregate (Einschlußkörperchen) gänzlich solubilisiert (MARSTON 1987, SINGH u. PANDA 2005), zum anderen ist der 6xHis-Tag unter diesen Umständen vollständig exponiert, was die Bindung an die Nickel-Matrix wesentlich erleichtert und die Effizienz der Reinigung verbessert.

Der Vergleich unterschiedlicher Methoden der Aufreinigung diente ebenfalls der Optimierung, wobei im Hinblick auf einen Standardisierung vor allem zeitlicher Aufwand im Verhältnis zur Sauberkeit des Proteins eine maßgebliche Rolle spielte. Die eingesetzten Aufreinigungsverfahren waren zwar alle praktikabel, wiesen aber in mancher Hinsicht Mängel auf. So konnte im sogenannten „Batch“-Verfahren, bei dem das Lysat mit flüssiger Nickel-NTA-Agarose gemischt und das rekombinante Protein durch Puffer mit abnehmenden pH-Werten eluiert wird, eine zumeist gute Reinigung erreicht werden. Nachteil dieser Methode aber war der hohe Zeitaufwand durch die notwendige gründliche Durchmischung von Lysat und Agarose, die exakte Einstellung der Puffer mit vier verschiedenen pH-Werten (pH 8,0; pH 6,3; pH 5,9; pH 4,5) sowie das langwierige und störanfällige manuelle Durchpressen der Wasch- und Elutionsflüssigkeiten durch den Agarose-zurückhaltenden Filter. Zudem ließen sich einige Yops bereits mit pH-Werten um 6,3 eluieren, was die Ausbeute an reinem Protein im Eluat erheblich schmälerte. Eine modifizierte Methode nutzten VON PAWEL-RAMMINGEN et al. (2000), die rekombinant in *Y. pseudotuberculosis* hergestelltes YopE mit

Guanidin-HCL-haltigen Puffern wuschen und eluierten. Gu-HCL ist allerdings für die weitere Bearbeitung des Proteins eher ungeeignet, (s.u.) so dass es während dieser Arbeit nur in Ausnahmefällen bei sonst unlöslichen Proteinen angewandt werden sollte.

Der Ni-NTA-Spin-Kit dagegen eignete sich gut als schnelle Screening-Methode, mit der exprimierende Klone durch die Bindung der His-tag-Fusionsproteine an die Ni-NTA-Säulen sicherer als in der Vollzellpräparation detektiert werden konnten. Zwar mussten auch bei dieser Methode Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten hergestellt werden, aber der Wasch- und Elutionsvorgang umfasste insgesamt fünf zweiminütige Zentrifugationsschritte, was die Arbeitszeit wesentlich verkürzte. Für eine gründliche Reinigung größerer Proteinmengen sind die Säulen mit einer Bindungskapazität von 150 µg 6xHis-tagged Protein nicht ausgelegt, bei Überschreiten der Kapazität gelangten die ungebundenen Proteine in den Durchfluss (**Abbildung 8**).

Die Methode der Wahl, eine Reinigung über Säulen mit einer Matrix bestehend aus 1 ml oder 5 ml Sepharose (Chelating Sepharose High Performance), kombiniert mit Nickel-Ionen, erbrachte bereits bei der manuellen Durchführung eine gute Aufreinigung der einzelnen Yops. Der Zeitaufwand war geringer als bei der Nickel-NTA-Agarose, da Wasch- und Elutionsvorgang nicht mit Puffern verschiedener pH-Werte, sondern mit einer für jedes Yop festgelegten Konzentration an Imidazol erfolgte (**Tabelle 9**). Ein Teil der Struktur der Aminosäure Histidin besteht aus einem Imidazolring und diese Imidazolringe sind für die Bindung der 6xHis-Tags an den Nickelionen der Matrix verantwortlich. Da reines Imidazol ebenfalls an den Nickelionen bindet, verdrängt es in niedrigen Konzentrationen (10-60 mM) unspezifisch gebundene, Histidin enthaltende, kontaminierende Fremdproteine (untagged background proteins), während die 6xHis-Tag-Fusionsproteine weiterhin mit hoher Affinität an den Nickelionen der Matrix gebunden bleiben. Erst eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 100 bis 200 mM führt zu einer Dissoziation der Fusionsproteine, die nicht länger um Bindungsstellen an der Matrix konkurrieren können. Je näher man bei der Optimierung der Imidazolkonzentration im Waschpuffer für die jeweiligen Yops diesem Dissoziationspunkt kam, desto stringenter konnte man die an der Säulenmatrix gebundenen Yops waschen. Diese Feinabstimmung der Imidazolkonzentration trug maßgeblich zur Reinheit des Proteins bei. Gleichzeitig mit der Optimierung von Wasch- und Elutionsbedingungen sollte auch die geeignetste Methode zur Lyse der Zellen für jedes einzelne Protein bestimmt werden. Auch hier zeigte sich eine große Divergenz innerhalb dieser *Yersinia*-Antigene (**Tabelle 9**). Eine der gängigen Lysemethoden, das Schwenken auf einer Wippe bei Raumtemperatur im Lysepuffer, konnte für YopD, YopM, YopN, YopP und YopT mit guter Ausbeute angewandt werden. Der überwiegende Teil des gelösten Proteins befand sich nach einer Stunde im Lysat, während das ebenfalls im Proteingel überprüfte Zellpellet keine oder nur eine schwache Bande auf Höhe des jeweiligen Yops aufwies. Die denaturierenden Eigenschaften des Harnstoffs im Lysepuffer reichten allerdings bei YopD und YopT nicht aus, hier konnte eine Solubilisierung ausschließlich mit dem stärker denaturierenden Guanidin-Hydrochlorid erzielt werden. Wasch- und Elutionspuffer konnten bei YopT dann auf Harnstoff umgestellt werden, ohne dass das

Protein ausfiel. YopD allerdings musste während der gesamten Reinigung in GuHCl-haltigen Puffern verbleiben. GuHCl wird oft zur Solubilisierung stark hydrophober Membranproteine empfohlen, bei YopD sind solche hydrophoben Transmembran-Domänen für die vermutete Bildung der Pore in der Zielzelle verantwortlich. YopT dagegen findet sich nach der Translokation vorzugsweise assoziiert an der Innenseite der Membran der befallenen Zelle. Dementsprechend könnte YopT auch nach seiner Expression in der Wirtszelle membranassoziiert vorliegen, was die Notwendigkeit des stark denaturierenden GuHCl im Lysepuffer erklären könnte. Da Proteine in GuHCl-haltigen Puffern vor der Elektrophorese umgepuffert oder gefällt werden müssen, wurde diese Substanz nur verwendet, wenn die Denaturierung mit Harnstoff kein Ergebnis brachte. Bei den übrigen Proteinen, YopE, YopH, YopO und LcrV, war die Lyse der Zellen mit Harnstoff-haltigen Puffern zwar möglich, erbrachte aber eine geringe Konzentration an Protein, während das Zellpellet noch große Mengen des gesuchten Yops enthielt. Bei YopO und YopE, die relativ schwach exprimiert wurden, ergab sich zusätzlich das Problem, dass das Lysat einen starken Anteil an *E. coli*-Protein enthielt. Hier half eine primäre Destruktion des Pellets mit Ultraschall im milden Sörensen-Puffer. Der verworfene Überstand nach Zentrifugation enthielt zwar schon geringfügige Mengen des jeweiligen Yops, weitaus größer war aber der Anteil an Fremdprotein, der durch diesen ersten Zellaufschluss eliminiert werden konnte. Um die Yop-Proteine dann endgültig aus dem Pellet in Lösung zu bringen, eignete sich ein ca. einstündiges Schwenken des resuspendierten Pellets im Lysepuffer bei 60 °C. Die hohe Temperatur verbesserte offenbar die Solubilisierung ohne dem Protein dabei zu schaden. Bei einigen Yops (YopH, YopM und YopT), die mehrere Cysteinmoleküle enthielten, half die Zugabe von 10 mM β -Mercaptoethanol zum Lysepuffer bei der Spaltung eventuell vorhandener Disulfidbindungen zwischen *E. coli*-Wirt und Yop-Protein.

Um eine optimale Qualität für die kommerzielle Verwendung der Antigene im Immunoblot gewährleisten zu können, erfolgte die Reinigung nach den für jedes Protein determinierten Bedingungen mit Hilfe des Chromatographiesystems ÄKTA™ Purifier. Ein wesentlicher Vorteil bestand dabei in der Ausschaltung äußerer Einflüsse, die bei der manuellen Handhabung unvermeidbar sind, beispielsweise Lufteintrag beim Befüllen der Säulen oder ungleichmäßige Durchflußgeschwindigkeit beim Drücken des Spritzenkolbens. Auch eventuelle Fehler bei der Herstellung der Wasch- und Elutionspuffer wie zu hohe Imidazolkonzentration oder falsch eingestellte pH-Werte wurden durch Messung von Leitfähigkeit und Absorption während des Puffereintrages auf die Säulen minimiert. Anhand des Elutionsprofils und des Absorptionspeaks konnten aus den verschiedenen Aliquots die Fraktionen mit dem eluierten His-Tag-Fusionsprotein ausgewählt werden. Die Höhe der Absorption erlaubte dabei auch eine Schätzung der enthaltenen Proteinkonzentration der einzelnen Yops.

Wie wichtig die idealen Expressionsbedingungen für die spätere Reinheit der Proteine sind, zeigte sich an der gelegentlich im Eluat noch vorhandenen Menge an kontaminierenden *E. coli*-Proteinen bei schwächer exprimierenden Klonen. Es handelte sich zwar lediglich um winzige Spuren, aber um

genügende Reinheit garantieren zu können, wurde das Eluat nach Umpufferung mittels einer *E. coli*-Affinitätsmatrix von den letzten Verunreinigungen befreit. Generell waren von diesem zweiten Reinigungsschritt Yop-Proteine betroffen, die durch eher zufällig veränderte oder nicht optimal eingestellte Expressionsbedingungen einen größeren Anteil Fremdprotein aufwiesen. Eine Besetzung von Bindungsstellen durch diese Proteine kann nie ganz verhindert werden, außerdem können auch die His-Tag-Fusionsproteine trotz Lyse an *E. coli*-Proteine gebunden sein, die dann zusammen mit dem His-tag-Protein eluiert werden.

In **Tabelle 9** sind die unterschiedlichen Lyse-Methoden und Eluatpuffer für die einzelnen Yops zusammengefasst. Die Reinigung der Yops über Nickel-NTA-Säulen wurde auch in anderen Studien favorisiert, allerdings kamen auch Lyse-Methoden, wie zum Beispiel mittels French Press zum Einsatz (REITHMEIER-ROST 2005), über die allerdings nicht jedes Labor verfügt. BENNER et al. (1999) klonierten u.a. LvrV, YopO, YopD, YopE, YopH und YopN von *Y. pestis* größtenteils ebenfalls in BL21(DE3)pLysS-Stämmen, lysierten die Proteine mit 6M Urea und reinigten sie mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie. Hier wurden offenbar keine Guanidin-haltigen Puffer für YopD benötigt, allerdings geht aus der Studie nicht ganz hervor, welches Vektor-Wirt-System genau für YopD eingesetzt wurde. Es ist durchaus möglich, dass sich YopD bei anderen Expressionsbedingungen auch mit Urea lösen läßt, außerdem kann das Protein aus einem *Y. pestis*-Stamm anders konfiguriert sein.

5.2 Herstellung von Hyperimmunseren und Immunoblots sowie Charakterisierung der Antikörperantwort gegen *Y. enterocolitica* beim Schwein

5.2.1 Immunisierung

Erwartungsgemäß verlief die Suche nach Schweinen, die unter Feldbedingungen frei von Antikörpern gegen Yersinien waren, nicht sofort erfolgreich. In der letzten Zeit entstanden bereits einige Arbeiten zur Prävalenz von Anti-Yop-Antikörpern bei unterschiedlichen Tierarten wie Schlachtschweinen (HENSEL et al. 2004), Schafen und Ziegen (NIKOLAOU et al. 2005), Wildschweinen (AL DAHOUK et al. 2005), Rindern (BARTLING et al. 2004a) und Feldhasen (BARTLING et al. 2004b). Die ermittelte Seroprävalenz reichte dabei von 65,7 % bei Rindern bis hin zu 96,3 % bei Schlachtschweinen. Auch nach einer in allen Studien angewandten diskussionswürdigen, aber konservativen Befundinterpretation, bei der erst drei Banden und mehr auf dem Teststreifen als positives Ergebnis gewertet wurden, lag der Anteil an positiven Schlachtschweinen noch bei 45,4 %, bei Wildschweinen sogar bei 62,6 %. HENSEL et al. (2004) begründeten die Bewertung ihrer Ergebnisse (positiv, wenn Antikörper gegen mehr als 50 % der Testantigene nachgewiesen werden) mit eventuellen Kreuzreaktionen zu anderen Bakterien mit Typ-III-Sekretionsapparat und der

Verwendung eines nicht für die jeweilige Tierart validierten Testkits. Alle Untersuchungen wurden mit dem humanmedizinisch validierten recomBlot durchgeführt.

In dieser Arbeit kamen verschiedene Blotsysteme zum Einsatz, um die Ergebnisse der entwickelten Teststreifen mit den auflinierten Yops auch mit natürlich exprimierten Yops und dem recomBlot vergleichen zu können. Dabei ging es hauptsächlich um die Bestätigung einer positiven oder negativen Reaktion, da aufgrund der unterschiedlichen Beschichtungstechnik und vor allem der verwendeten Antigene (nicht einzeln definierbare natürlich exprimierte Yops bzw. begrenzte Anzahl rekombinanter, elektrophoretisch aufgetrennter Yops beim recomBlot) kein direkter Vergleich der Bandenmuster möglich war. Im Gegensatz zu den genannten Studien bei den verschiedenen Tierarten wurden in dieser Arbeit die getesteten Schweine nur dann als negativ eingestuft, wenn keine einzige positive Bande zu sehen war: Zum einen sollten die zu immunisierenden Tiere nachweislich frei von *Yersinia*-Antikörpern sein um einen Boost-Effekt auszuschließen, zum anderen wurden die Streifen beispielsweise an über 40 Schweineseren getestet, die Antikörper gegen sieben verschiedene *Salmonella*-Serovare und apathogene *Yersinien* besaßen, ohne dass positive Banden detektiert wurden. Eine Kreuzreaktivität gegen *Salmonellen* kann so zumindest weitgehend ausgeschlossen werden. Weitere, im Zuge der hohen Seroprävalenz verdächtige Kreuzreaktionen wie z.B. gegen *Pseudomonas* spp. (HENSEL et al. 2004) könnten nur mit spezifischen Seren abgeklärt werden, die aber vermutlich erst aufwändig im Tierversuch hergestellt werden müssten.

Mit den auflinierten Antigenen konnten sowohl *Yersinia*-positive als auch *Yersinia*-negative Schweine identifiziert werden. Da insgesamt in den Beständen nur Seren von einigen Sauen, die unmittelbar oder in nächster Zeit ferkeln sollten, untersucht wurden, lässt sich trotz der recht hohen Zahl an Yop-Antikörper-positiven Tieren kein Rückschluss auf den Rest des Bestandes ziehen. Gerade ältere Sauen können im Laufe ihres Lebens durch unterschiedliche Vektoren mit dem Erreger in Berührung gekommen sein. Bei Wildschweinen stieg die Zahl serologisch positiver Tiere mit zunehmendem Alter unabhängig vom Geschlecht signifikant an (AL DAHOUK et al 2005). Auch die geringe Zahl der untersuchten Bestände eignet sich nicht, um einen konkreten Hinweis auf die Prävalenz beim Schwein zu erhalten, zeigt aber, dass eine flächendeckende Untersuchung mit Hilfe der Teststreifen oder eines mit gleichen Antigenen produzierten ELISAs durchaus sinnvoll wäre. Die Möglichkeit der Klassifizierung serologisch negativer und positiver Bestände im Rahmen der Fleischgewinnung und –verarbeitung sollte in Anbetracht der Zahl humaner *Yersiniosen* nicht außer Acht gelassen werden.

Nach Abschluss der Immunisierung wurde die Yop-Antikörperbildung im Serum der zuvor negativ getesteten, immunisierten Schweine ebenfalls anhand der Teststreifen evaluiert. Das Ergebnis, eine Reaktion nicht nur gegen das jeweils verabreichte Antigen, sondern teilweise auch gegen andere Yops, warf die Frage nach Kreuzreaktionen der Yops untereinander oder nach einer Bindung der His-Tag-Antikörper an das jeweilige Yop-His-Tag-Fusionsprotein auf. Jedes Yop wird zusammen mit dem angehängten N-terminalen Polyhistidin (6 x His) exprimiert, um bei der Reinigung an einer

Nickelmatrix binden zu können. Bei der Klonierung wurde zwar ein Vektor verwendet, dessen 6x His-Tag im Bereich einer dafür vorgesehenen Schnittstelle nach der Reinigung entfernt werden könnte. Diese nachträgliche Abspaltung lässt sich in der Praxis aber zum Teil nur unvollständig durchführen und kann bei labileren Proteinen zu Problemen führen. Ein solches Yop-His-Tag-Fusionsprotein könnte auch eine Antikörperbildung gegen das fusionierte Histidin induzieren. Da es sich bei den auf die Blotstreifen aufgetragenen Antigenen ebenfalls um Yop-His-Tag-Fusionsproteine handelt (auch beim kommerziellen recomBlot), kann eine Antigen-Antikörper-Reaktion nicht ausgeschlossen werden. Allerdings wird der 6xHis-Tag allgemein als gering immunogen eingestuft und die Verwendung der gereinigten Antigene zur Herstellung von Immunsereen ohne vorherige Abspaltung des 6xHis-Tag wird auch vom Hersteller als unproblematisch beschrieben.

Da bisher nichts über serologische Kreuzreaktionen der Yops untereinander bekannt war, wurden versuchsweise natürlich exprimierte Yops als Antigengemisch auf eine Membran geblottet und diese mit jeweils einem der hergestellten Hyperimmunsereen inkubiert. Hätten sich dabei mehrere Banden pro Serum gezeigt, hätte dies ein Hinweis auf Kreuzreaktionen zwischen den Yops sein können. Aber selbst mit dem üblicherweise stark exprimierten YopD reagierte keines der Seren, außer dem Serum des mit YopD immunisierten Schweines, wobei hier nur eine Bande sichtbar wurde. Dagegen konnte die Theorie der kreuzreagierenden His-Tags mit einem Experiment unterstützt werden, bei dem ein 6xHis-Tag tragendes Prionprotein als Antigen im Western Blot fungierte. Ein solches Prionprotein weist keinerlei Verwandtschaft zu den *Yersinia*-Antigenen auf, trotzdem zeigten sich bei allen Hyperimmunsereen Banden, die somit höchstwahrscheinlich auf den Polyhistidinrest zurückzuführen sind. Letztendlich konnte die Spezifität der hergestellten Hyperimmunsereen allerdings nicht bewiesen werden, da auch die Yops im humanmedizinischen recomBlot oder recomLine den 6xHis-Tag noch enthalten und die Herstellung einer neuen Charge Teststreifen mit Yops, deren Polyhistidinrest abgespalten wurde, im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar war. Zudem ließ sich das eigentliche Ziel, die Charakterisierung der isotypspezifischen Antikörperantwort *Yersinia*-infizierter Schweine, unabhängig von eventuell immunogen wirkenden Histidinresten durchführen, da es sich bei dem Infektionsstamm um gentechnisch unveränderte native *Y. enterocolitica*-Bakterien handelte.

5.2.2 Charakterisierung der systemischen Antikörperantwort

Da über die Antikörperantwort gegen eine *Yersinia*-Infektion beim akut oder persistent infizierten Schwein wenig bekannt ist, sollte in dieser Arbeit die Kinetik der Antikörper-Induktion mit Hilfe der rekombinant hergestellten, plasmidkodierten *Yersinia*-Antigene ermittelt werden und somit gleichzeitig die Eignung der Yops als Immunogene im erarbeiteten Testsystem auch für die veterinärmedizinische Diagnostik geprüft werden.

Wie die dargestellten Abbildungen zum Verlauf der systemischen Antikörperantwort zeigen, scheinen die Yops, allen voran YopD, hoch immunogen zu sein und bereits in den ersten Tagen der Infektion

eine starke Antikörperbildung zu induzieren. Neben dem frühen Einsetzen der IgA-vermittelten Antikörperantwort nach sieben Tagen ist die zeitige IgG-vermittelte Reaktion besonders auffallend. Hier sind bereits nach zehn Tagen erste Antikörper gegen YopD detektierbar. In einer Studie mit infizierten Kaninchen fanden HEESEMANN et al. (1988) ebenfalls nach sechs Tagen Antikörper der Klasse IgA und IgM gegen plasmidkodierte Antigene, gefolgt von IgG nach neun Tagen. Auch FERNANDEZ-LAGO et al. (1994) konnten innerhalb der zweiten Woche nach Infektion bei Kaninchen IgG-Antikörper nachweisen. Hier traten zuerst Antikörper gegen YopH auf, ab der dritten Woche dann auch gegen LcrV und YopN, allerdings wurden die Yops nur anhand ihrer Molekulargewichte klassifiziert.

Die von GAEDE et al. (1992) bei der Untersuchung experimentell mit *Y. enterocolitica* Serovar O:8 infizierter Ratten ermittelten Ergebnisse, denen zufolge in der akuten Phase vor allem Antikörper gegen YopD, LcrV, YopH und nachfolgend YopE gebildet wurden, konnten in dieser Untersuchung auch mit Serovar O:3 bei Schweinen bestätigt werden. YopD und LcrV sind bei der Infektion einer Zelle für die Translokation der übrigen Yops verantwortlich und werden daher zeitlich möglicherweise auch eher gebildet. Trotzdem ist ein Zusammenhang zwischen der Reihenfolge, mit der die Yops sezerniert werden, und der Reihenfolge der gebildeten Antikörper unwahrscheinlich, da sich die Sekretion innerhalb weniger Minuten vollzieht. Es scheint viel mehr so, dass diese vier Yops den mengenmäßig größten Anteil an sezernierten Proteinen ausmachen. Dafür spricht die Tatsache, dass sie bereits ab Mitte der Achtziger Jahre in den primären Studien zum Sekretionsvorgang und zum immunologischen Geschehen erwähnt werden. Zur damaligen Zeit lautete die Nomenklatur noch anderes, doch es waren stets diese vier Proteine, deren Expression beobachtet wurde und die eine Antikörperbildung induzierten (HEESEMANN et al. 1987, STAHLBERG et al. 1987, HEESEMANN 1990). Die übrigen Yops wurden erst später entdeckt, weil sie nur in geringen Mengen vom Wildstamm in die Wirtszelle injiziert werden (YopO und YopP), oder wie YopT nur in Polydeletionsmutanten (Δ YopH, O, P, E, M) exprimiert und identifiziert werden konnten (IRIARTE u. CORNELIS 1998).

Ob Proteine wie YopM, YopN, YopP und YopT, die beim beschriebenen Infektionsversuch nur zum Teil und eher in der zweiten Hälfte des Versuchszeitraumes eine Antikörperbildung der Klassen IgG und IgA induzierten, eventuell zu einem späteren Zeitpunkt immunogen wirken, ließ sich mit diesem 33 Tage dauerndem Infektionsmodell nicht abschließend klären. FERNANDEZ-LAGO et al. (1994) fanden zwar bei orogastral infizierten Kaninchen nach der zweiten Woche IgG-Antikörper gegen YopN bzw. gegen ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa. Ob es sich dabei tatsächlich um YopN handelt, ist nur anhand der Zuordnung zum Molekulargewicht nicht zweifelsfrei feststellbar, zumal YopN mittlerweile mit einem Molekulargewicht von 32,6 kDa (CORNELIS 1998) bzw. 32,9 kDa (NCBI-Datenbank/Swiss Prot.) angegeben wird. Genau so gut könnte es sich dabei um YopD oder auch YopT gehandelt haben. Erste Untersuchungen von Feldseren mit Hilfe der neu entwickelten Teststreifen lassen eher vermuten, dass diese Proteine in der Antikörperantwort eine untergeordnete

Rolle spielen und Antikörper gegen diese „minor Yops“ keinesfalls die Stärke der Antikörperantwort der „major Yops“ übertreffen. Es hat eher den Anschein, als würden nur bei einer starken Infektion bzw. einer ausgeprägten Immunreaktion auch gegen diese Yops Antikörper gebildet werden, wobei die detektierten Banden schwächer erscheinen als bei YopH, LcrV, YopE und YopD.

Die bisherigen Feldstudien zur Seroprävalenz bei unterschiedlichen Tierarten (HENSEL et al. 2004, NIKOLAOU et al. 2005, AL DAHOUK et al. 2005, BARTLING et al. 2004a, BARTLING et al. 2004b) können nur teilweise zu einem Vergleich herangezogen werden. Zum einen ist hier unbekannt, wann die Tiere Kontakt zum Erreger hatten, zum anderen beinhaltet der recomBlot nur die Antigene YopM, YopH, LcrV, YopD und YopE. Interessant ist aber, dass bei einem Großteil der Tiere Antikörper gegen YopM nachweisbar sind, beim Schlachtschwein sogar in 89,7 % der Fleischsäfte. In dieser Arbeit waren bei fünf von neun Schweinen Antikörper gegen YopM nachweisbar, die Reaktion setzte erst zu einem späteren Zeitpunkt ein, zwei Schweine serokonvertierten zwischen Tag 14 und 17, der Rest erst gegen Ende des Versuchszeitraumes von 33 Tagen. Es ist daher durchaus denkbar, dass IgG gegen YopM später gebildet wird und vielleicht dann lange nachweisbar bleibt. Antikörper gegen YopH dagegen wurden mit dem recomBlot nur bei 18,7 % der Schlachtschweine ermittelt, in der vorliegenden Arbeit aber bei allen neun Schweinen. Hier ist wiederum möglich, dass Antikörper gegen YopH früh gebildet werden und eher wieder verschwinden. Allerdings fällt beim Molekulargewicht der Antigene eine Diskrepanz zum recomBlot auf. Die in dieser Arbeit exprimierten Proteine YopH und YopM haben ein Gewicht von 51 kDa und 41,3 kDa (BOLAND et al. 1996, LEUNG u. STRALEY 1989). Beim recomBlot wird YopH mit 46 kDa und YopM mit 58 kDa angegeben, durch die elektrophoretische Auftrennung beim recomBlot liegt YopM damit oberhalb der YopH-Bande. Das Molekulargewicht von YopM kann zwar je nach Serovar schwanken, maximal aber beträgt es 56,9 kDa bei Serovar O:8 (BOLAND et al. 1998). YopH hat eine konstante Größe von 51 kDa und wurde daher auch vor Änderung der Nomenklatur als Yop51 bezeichnet (MICHIELS u. CORNELIS 1988), auch hier ist die Größenangabe von 46 kDa im recomBlot eigenartig. Es liegen keine Angaben vor, welches Virulenzplasmid für die Klonierung der Antigene des recomBlots verwendet wurde und ob die Proteine vollständig exprimiert wurden.

Gegen das Antigen YopD werden offenbar auch bei einer länger zurückliegenden Infektion mit *Y. enterocolitica* noch in hohem Maße Antikörper gebildet, bei allen Tierarten hatten die Antikörper gegen YopD den größten Anteil an der Immunantwort. Im Gegensatz dazu waren Antikörper gegen LcrV nur gering und mit schwachen Banden vertreten. Möglicherweise spielen auch diese Antikörper nur bei der frühen Abwehr eine Rolle, da sie bei experimentellen Infektionen mit Hasen und Ratten ebenfalls frühzeitig und stark detektiert werden konnten (FERNANDEZ-LAGO et al. 1994, GAEDE et al. 1992). Ferner muß erwähnt werden, dass der recomBlot nur zu humanmedizinisch-diagnostischen Zwecken und nicht für verschiedenste Tierarten validiert ist.

Die IgM-Antwort war in dieser Arbeit größtenteils nur unpräzise verifizierbar, da inverse Farbreaktionen, eine vollständige Einfärbung der Streifen und Antigen-Antikörperreaktionen im Serum vor der Infektion die Beurteilung erschwerten. Als Schlussfolgerung liegt nahe, dass die Ferkel womöglich bereits beim Kauf an einer frischen Yersinien-Infektion litten und zu diesem Zeitpunkt lediglich noch keine messbaren IgG-Antikörper gegen *Y. enterocolitica* auftraten. Das würde die rasche IgA- und IgG-Bildung nach der experimentellen Infektion, die dann quasi wie ein Boost gewirkt hätte, erklären. Da die Schweine aber ununterbrochen und auch bereits Wochen vor der Infektion kulturell anhand von CIN-Agarplatten, verbunden mit selektiver Anreicherung der Kotproben untersucht wurden und erst nach der experimentellen Infektion Yersinien mit dem Kot ausschieden, kann eine solche frühe Infektion weitgehend ausgeschlossen werden. Vielmehr scheinen die spezifischen Antikörper der Klasse IgM gegen die Yops zumindest bei diesen Schweinen zu unspezifisch zu sein und auch andere Antigene zu binden. Ein deutlicher Anstieg der Antikörperantwort in den ersten Tagen nach der Infektion ist aber zu verzeichnen und stellt sicherlich eine spezifische Reaktion auf den verabreichten Yersinienstamm dar. HEESEMANN et al. (1987) konnten bei Kaninchen nach sechs Tagen IgM-Antikörper gegen *Y. enterocolitica* verzeichnen, laut Molekulargewicht handelte es sich dabei wahrscheinlich um YopD und YopH.

Zusammenfassend ließen sich durch eine Untersuchung des Serums anhand der Blotstreifen mit den auflierten rekombinanten Yop-Antigenen infizierte und nicht infizierte Schweine zweifelsfrei voneinander unterscheiden. Dabei gelang die Abgrenzung nicht nur bei den akut infizierten und kulturell positiven Schweinen, sondern auch bei Sauen und Ferkeln verschiedener Bestände, die zum Zeitpunkt der Untersuchung bakteriologisch negativ waren. Hier konnten sowohl serologisch positive als auch negative Schweine identifiziert werden.

Damit würde sich der Test sehr gut zur serologischen Überprüfung und Überwachung von Schweinebeständen eignen.

5.2.3 Charakterisierung der lokalen Antikörperantwort

Die Untersuchung der Sekrete verschiedener Darmabschnitte und der Gelenkflüssigkeit zum Zeitpunkt der Tötung der 18 Schweine sollte im Wesentlichen die Frage beantworten, ob die Yops in diesen Sekreten überhaupt detektierbar sind, welche Antikörperklassen gebildet werden und ob sich die Antikörperantwort im Serum von den Körperflüssigkeiten unterscheidet.

Die Untersuchung von Speichel und Tränenflüssigkeit dagegen, sollte vor allem Aufschluss darüber geben, ob durch diese Testvariante eine einfachere und schnelle Überprüfung der Antikörperantwort bei Schweinen möglich ist, die eine Blutabnahme erübrigen könnte.

Mit einer Verdünnung von 1:5 bei den Darmsekreten, bei der Synovia 1:10, ließen sich sowohl spezifische Antikörper der Klasse IgA als auch IgG gegen Yops detektieren. Obwohl generell in den Körperflüssigkeiten mehr sekretorisches IgA zu erwarten gewesen wäre, fiel die IgG-Antwort auf den

Teststreifen mindestens genauso stark aus. Dabei korrelierten die Ergebnisse im Serum grundsätzlich mit denen in den Darmsekreten, das heißt, Yops gegen die im Serum nur eine schwache oder keine IgG-Antikörperantwort zu verzeichnen war, induzierten auch im Darm keine stärkere Immunreaktion. Bei der Analyse der Gelenkflüssigkeiten dagegen fiel auf, dass bei allen Schweinen spezifische Antikörper gegen YopM detektiert werden konnten, selbst wenn dies im Serum nicht möglich war. Bisher wurden vor allem Immunkomplexe für die Reaktive Arthritis verantwortlich gemacht. Die starke Antikörperbildung gegen Yops in der Gelenkflüssigkeit, die zudem leicht von der Kinetik und Zusammensetzung der Antikörperbildung im Serum abweicht, könnte ein Hinweis auf das, möglicherweise kurzzeitige, Vorhandensein von Yersinien in den Gelenken sein. In der Humanmedizin wird seit längerem diskutiert, ob die als steril geltende Reaktive Arthritis nicht doch eher als postinfektiöse Arthritis mit bakterieller Beteiligung bewertet werden muß (HANNU et al. 2006). Zwar konnten zu keinem Zeitpunkt kultivierbare Yersinien in der Synovia von erkrankten Patienten nachgewiesen werden, aber mittels Immunofluoreszenz konnten in den Zellen der Synovia *Yersinia*-Antigene wie LPS und so genannte bacterial ghosts, also die vollständige Hülle der Yersinien ohne Zytoplasma entdeckt werden (GRANFORS et al. 1989, MEYER-BAHLBURG et al. 2001). GASTON et al. (1999) konnten mit Hilfe spezifischer Primer *Yersinia* 16S rRNA in der Synovia einer Patientin nachweisen. Es ist also möglich, dass sich Yersinien auch außerhalb des Darms z.B. in Gelenke zurückziehen können, um dort eine Entzündungsreaktion auszulösen. Bei der experimentellen Infektion humaner Synovialzellen mit *Y. enterocolitica* O:3 waren die Erreger sechs Wochen lang kultivierbar (HUPPERTZ u. HEESEMANN 1996).

Die Untersuchung von Speichel und Tränenflüssigkeit auf spezifische Yop-Antikörper der Klasse IgG ergab keine Reaktion, die Untersuchung auf Antikörper der Klasse IgA verlief dagegen positiv. Dabei konnten im Speichel von acht der neun infizierten Schweine Antikörper gegen YopH, YopD, LcrV, YopO und gelegentlich YopE detektiert werden, bei einem Schwein fiel die lokale Antikörperantwort generell so schwach aus, dass hier eine falsche Verdünnung der Proben nicht ausgeschlossen werden kann. Leider war keine weitere Speichelprobe vorhanden, um das Ergebnis zu verifizieren, so dass nur acht der neun Schweine korrekt beurteilt werden konnten. Nicht infizierte Schweine bildeten keine Antikörper gegen Yops. Da die Speichelprobennahme einfach durchzuführen ist und die Schweine ausnahmslos gerne auf dem angebotenen Wattestäbchen herumkauen, wobei sie den Wattekopf einspeicheln, würde diese Testvariante eine deutliche Vereinfachung der Bestandsüberwachung darstellen. Allerdings ist die Speichelüberprüfung bisher nur bei der akuten experimentellen Infektion durchgeführt worden, Daten für persistent infizierte Schweine liegen nicht vor.

5.3 Fazit und Ausblick

Die Auswertung der Daten aus einer experimentellen Infektion von Schweinen mit *Y. enterocolitica* O:3 erfolgte mittels der in dieser Arbeit entwickelten Blotstreifen. Alle infizierten Schweine bildeten Antikörper gegen den orogastral verabreichten Erreger. Die Erfassung dieser Antikörperantwort gelang sehr gut mittels der auf den Teststreifen auflinierten Yops, es zeigten sich klare, gut voneinander abgesetzte Banden unterschiedlicher Intensität. So konnten nicht nur Anstieg und Abschwächung sondern auch die Kinetik der Antikörperantwort bezüglich der einzelnen Yops während einer frühen Infektion beurteilt werden. Damit ist eine Grundlage und auch eine Dringlichkeit für weitere Untersuchungen dieser Art geschaffen worden. Ähnliche Infektionsversuche über einen längeren Zeitraum könnten klaren Aufschluß darüber geben, wann welches Yop eine Antikörperbildung induziert und ob gewisse Muster Hinweise auf den derzeitigen Immunstatus des Tieres und damit auf den Zeitpunkt der Infektion geben. Da bisher nur humanmedizinisch validierte Immunoblots auf Basis der Yop-Antigene für Untersuchungen erhältlich sind, schließt der in dieser Arbeit entwickelte Test eine wichtige Lücke in der Gesundheitsüberwachung beim Schwein. Besonders geeignet ist er für die Einzeltieruntersuchung, beispielsweise zur Statusfeststellung bei Muttersauen oder Zukäufen, oder auch für die Überwachung kleinerer Bestände. Hier würde der Test günstiger als ein ELISA sein, für den ein gewisser Probendurchsatz zur Rentabilität nötig ist. Außerdem könnte für ein einfaches Bestands-Screening die Anzahl der Yop-Antigene auf dem Teststreifen verringert werden, so dass die Herstellungskosten geringer ausfallen. Die volle Anzahl Yops spräche zwar für eine höhere Sensitivität, aber bei den Untersuchungen von Wildschweinen und Schlachtschweinen reichten die Antigene YopH, YopM, LcrV, YopD und YopE, um bei über 90 % der Tiere Antikörper nachzuweisen (AL DAHOUK et al. 2005, HENSEL et al. 2004). Daher ist es fraglich, ob mit zusätzlichen Antigenen wie YopP, YopT oder YopN noch weitere positive Tiere detektiert werden könnten. Eine Validierung des Tests für Speichel würde eine zusätzliche Vereinfachung der Probennahme und demzufolge auch eine Kostensenkung bedeuten.

Ein weiterer Vorteil dieses Testsystems ist seine einfache Auswertbarkeit. Elektrophoretisch aufgetrennte Antigene verlieren während des Blotting-Vorganges oftmals ihre ursprüngliche Auftrags-Konzentration. Welche Proteinkonzentration letztendlich auf der Membran verbleibt, ist nicht bestimmbar. Außerdem erscheinen die Banden nach der Detektion oft verwischt, mit verschiedenen Farbtintensitäten und nicht klar abgegrenzt. Bei der Auflinierung der Antigene dagegen wird jedes Yop mit einer definierten Proteinmenge dosiert aufgesprüht, die Anordnung der Proteine ist dadurch ebenfalls frei wählbar, Konjugat- und Reaktionskontrollen können beliebig hinzugefügt werden. Durch die scharfe Trennung der Banden ist das Ergebnis gut ablesbar. Ein Nachteil ist hierbei natürlich, wie bei allen Westernblot-Methoden, das eher subjektive Ablesen und Beurteilen von schwach positiven Banden. Hier könnte möglicherweise eine Cut Off-Bande eingesetzt werden, deren Anfärbung als Vergleich dient. Wünschenswert, aber kaum umsetzbar, ist allerdings eine Automatisierbarkeit, wie sie beim ELISA gegeben ist. Vor allem eine längerfristige Sicherung der

Ergebnisse kann nur durch eine Fotodokumentation bzw. dem Einscannen der entwickelten Blotstreifen erfolgen. Trotzdem kann ein solches Testsystem gerade für kleinere Labore, die technisch gar nicht mit ELISA-Laufstrecken oder ähnlichem Equipment ausgerüstet sind, sehr interessant sein, allen voran für den Tierarzt selbst, der mit minimalster Ausrüstung den Test in der eigenen Praxis durchführen kann.

In der Humanmedizin, wo sich der *Yersinia*-Immunoblot seit Jahren schon durchgesetzt hat, da hauptsächlich der einzelne Patient im Mittelpunkt der Untersuchung steht, wird eine Erweiterung bzw. Umsetzung in ein ELISA-Format gegebenenfalls nur für größere diagnostische Einrichtungen in Frage kommen. Ganz anders liegt der Fall in der Intensivtierhaltung. Um nicht nur Einzeltiere oder Mutterbetriebe untersuchen zu können, sondern große Mastbetriebe in der Gesundheitsüberwachung zu unterstützen, sollten die Blotstreifen sinnvollerweise durch ein ELISA-Format ergänzt werden. Vorversuche hierzu haben bereits gezeigt, dass die Umsetzung mit einer kleinen Menge ausgewählter Yops als Antigengemisch hervorragend funktioniert. Gerade in Anbetracht einer zukünftigen Zoonoseverordnung können sichere serologische Nachweise einen Aufbau erregerefreier oder zumindest überwachter Bestände gewährleisten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Melanie Hassel

Charakterisierung der isotypspezifischen systemischen und lokalen Antikörperantwort gegen *Yersinia enterocolitica* bei experimentell infizierten Schweinen

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juli 2007

102 Seiten, 28 Abbildungen, 10 Tabellen, 318 Literaturangaben, 1 Anhang

Schlüsselworte: *Yersinia enterocolitica*, Schwein, serologisches Nachweissystem, Yops, Infektionsmodell, Immunoblot, Seren, Speichel, Darmsekrete

Die humane Yersiniose wird durch Lebensmittel tierischen Ursprungs übertragen und stellt aufgrund der jährlich gleichbleibend hohen Zahl übermittelter Krankheitsfälle sowie der wahrscheinlich weitaus höheren Dunkelziffer ein Problem des gesundheitlichen Verbraucherschutzes dar. Die intermittierende Ausscheidung des Erregers *Yersinia enterocolitica* beim klinisch unauffälligen Reserviertier Schwein und die aufwändige Kultivierung erschweren den direkten Erregernachweis. Hier könnte der serologische Nachweis, in der Humanmedizin bereits seit langem etabliert, eine wertvolle diagnostische Hilfe sein. Die Erkennung serologisch positiver Bestände ähnlich dem Salmonellen-Monitoring und daran anschließende Hygienemaßnahmen, vor allem vor und während der Schlachtung, können den Eintrag des Erregers in die Lebensmittelkette vermindern.

So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein hochspezifisches serologisches Nachweissystem entwickelt, das durch die Verwendung rekombinanter und ausschließlich bei pathogenen Yersinien vorkommender Antigene eine hohe Sensitivität und Spezifität garantiert. Neun ausgewählte *Yersinia* Outer Proteins (Yops) wurden kloniert und mit spezifisch auf jedes Protein abgestimmten Bedingungen zur optimalen Expression gebracht. Durch die Evaluierung verschiedener Aufreinigungssysteme konnten schließlich reproduzierbare hochreine Antigene auch in großen Mengen hergestellt werden. Mit Blick auf eine sichere Auswertbarkeit bei der Verwendung des Testsystems in Laboratorien wurden die Antigene nicht elektrophoretisch aufgebracht, sondern mittels Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran aufliert. Das gebrauchsfertige Testsystem, Blotstreifen von 2,5 mm Breite mit neun auflierten, rekombinant hergestellten und Virulenzplasmid-basierenden *Yersinia*-Antigenen, eignet sich zur Diagnostik serologisch positiver Schweine. Mit Hilfe dieses Testsystems wurde die isotypspezifische Antikörperantwort von Schweinen im Infektionsmodell gegen den Erreger *Y. enterocolitica* ausgewertet. Nach zwei Vorversuchen mit jeweils zwei Schweinen wurden im Hauptversuch neun Ferkel experimentell mit einer Infektionsdosis

von 5×10^{11} KBE per Magenschlundsonde infiziert, wobei die Tiere nach leichtem und kurzfristigem Durchfallgeschehen den Erreger symptomlos mit dem Kot ausschieden. Weitere neun Ferkel stellten eine Kontrollgruppe nicht infizierter Tiere dar. Vom Tag der Infektion bis zum Tag der Tötung (Tag 33) wurde regelmäßig bei den achtzehn Schweinen Blut, Speichel und Tränenflüssigkeit gewonnen, am letzten Tag zusätzlich Gelenkflüssigkeit und Darmsekrete. Die Auswertung der Seren im zeitlichen Verlauf zeigte deutlich die Immunogenität der Yops. Bei dominierenden Yops wie YopO, YopH, LcrV, YopD und YopE ließ sich das Einsetzen der Antikörperbildung (IgG und IgA) mit nachfolgendem Anstieg bei allen infizierten Tieren feststellen. Die früheste Bildung von Immunglobulin G konnte am Tag 10 gegen YopD verzeichnet werden, Immunglobulin A wurde gegen YopD bereits am Tag 7 gebildet. Die nicht infizierten Kontrolltiere waren im Immunoblot durchgehend negativ. In den Darmsekreten, der Gelenk- und Tränenflüssigkeit und vor allem im Speichel liessen sich mit dem entwickelten Test ebenfalls spezifische Yop- Antikörper detektieren. Der Test kann somit zur Diagnostik von Beständen mit *Yersinia*-Problematik herangezogen werden; er eignet sich als kompletter Kit sowohl für Labore als auch für veterinärmedizinische Praxen.

7 Summary

Melanie Hassel

Characterization of the isotype specific systemic and local immune response against *Yersinia enterocolitica* in experimentally infected piglets

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in July 2007

102 pages, 28 figures, 10 tables, 318 references, 1 appendix

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, pig, serological detection system, Yops, infection model, immunoblot, sera, saliva, intestinal secretion

Food originating from animals is known as a potential source of human Yersiniosis. Due to the constantly high number of reported cases every year and an estimated significantly higher number of unreported cases, human Yersiniosis is of major concern in terms of consumer protection. The intermittent excretion of *Yersinia enterocolitica* by asymptomatically infected pigs showing no clinical signs of illness as well as the laborious cultivation protocols complicates direct pathogen detection. The serological detection system, long term established in human medicine, could be of great diagnostic asset here. The identification of serologically positive herds similar to Salmonella monitoring programmes followed by hygienic sanctions, particularly during the process of slaughtering, should be considered to prevent or decrease the entry of the germ into the food chain. In this work a serological detection system based on recombinant produced antigens was developed. This system guarantees high sensitivity and specificity as the antigens used are exclusively found in pathogenic *Yersinia*.

The nine selected *Yersinia* Outer Proteins (Yops) were cloned and optimal expression conditions were determined for each protein. By evaluation of different purification systems, highly purified and reproducible antigens in large quantities could be generated. With regard to an easy and reliable interpretation of the test system for use in routine laboratories, electrophoretic separation of the antigens and subsequent blotting onto nitrocellulose membrane were avoided. Instead, a special spraying technique was used to prepare nitrocellulose strips with exactly defined amounts of highly purified recombinant Yops for the detection of Yop specific antibodies in serum. The ready to use test system consists of blot strips of 2.5 mm width presenting nine recombinant produced, virulence plasmid based *Yersinia* antigens. It is suitable for the diagnostics of serologically positive pigs.

Using this test system, the immune response against *Y. enterocolitica* in a pig infection model was evaluated. After two preliminary experiments with two pigs at a time, nine pigs were experimentally

infected with a dose of 5×10^{11} CFU per stomach tube. After short and moderate diarrhoea, the pigs excreted the germ with the faeces but showed no symptoms of disease. Another nine pigs represented a control group of non-infected animals. From the day of infection until the day of slaughtering (day 33), blood, saliva and lachrymal fluid of these eighteen pigs were continuously collected. On day 33, synovia and intestinal secretions were also collected.

The analysis of the sera of the time course clearly showed the immunogenicity of the Yops. Yops like YopO, YopH, LcrV, YopD und YopE induced a strong and increasing immune response (IgG and IgA) in all infected pigs. The earliest formation of immunoglobulin G was detected against YopD on day 10 whereas immunoglobulin A against YopD accumulates already after seven days. The non-infected control group was negative in the immunoblot at all times. Using the designed nitrocellulose strips, antibodies were also detected in synovia, intestinal and lachrymal fluids and, above all, in saliva.

Therefore, this test can be used for the diagnosis of herds suspected of carrying *Yersinia*. As a complete kit it is suitable for laboratories as well as for veterinary surgeries.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aizawa SI. Bacterial flagella and type III secretion systems. FEMS Microbiol Lett. 2001;202(2):157-64.
2. Al Dahouk S, Nöckler K, Tomaso H, Splettstoesser WD, Jungersen G, Riber U, et al. Seroprevalence of Brucellosis, Tularemia, and Yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from North-Eastern Germany. J Vet Med B. 2005;52:444-455.
3. Al-Hendy A, Toivanen P, Skurnik M. Lipopolysaccharide O side chain of *Yersinia enterocolitica* O:3 is an essential virulence factor in an orally infected murine model. Infect Immun. 1992;60:870-5.
4. Aldova E, Svandova E, Votypka J, Sourek J. Comparative study of culture methods to detect *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 on swine tongues. Zbl Bakt. 1990;272:306-12.
5. Aleksic S, Steigerwalt AG, Bockemühl J, Huntley-Carter GP, Brenner DJ. *Yersinia rhodei* sp. nov. isolated from human and dog feces and surface water. Int J Syst Bacteriol. 1987;37:327-32.
6. Aleksic S, Bockemühl J. Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. Immun Infekt. 1990;18(6):178-85.
7. Allaoui A, Woestyn S, Sluiter C, Cornelis GR. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. J Bacteriol. 1994;176(15):4534-42.
8. Allaoui A, Schulte R, Cornelis GR. Mutational analysis of the *Yersinia enterocolitica* virC operon: characterization of yscE, F, G, I, J, K required for Yop secretion and yscH encoding YopR. Mol Microbiol. 1995;18(2):343-55.
9. Anderson DM, Schneewind O. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. Science. 1997;278(5340):1140-3.
10. Andersson K, Carballeira N, Magnusson KE, Persson C, Stendahl O, Wolf-Watz H, et al. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. Mol Microbiol. 1996;20(5):1057-69.
11. Andersson K, Magnusson KE, Majeed M, Stendahl O, Fallman M. *Yersinia pseudotuberculosis*-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. Infect Immun. 1999;67(5):2567-74.
12. Andor A, Trulzsch K, Essler M, Roggenkamp A, Wiedemann A, Heesemann J. YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. Cell Microbiol. 2001;3(5):301-10.
13. Andrews GP, Strachan ST, Benner GE, Sample AK, Anderson GW, Adamovicz JJ, et al. Protective efficacy of recombinant *Yersinia* outer proteins against bubonic plague caused by encapsulated and nonencapsulated *Yersinia pestis*. Infect Immun. 1999;67(3): 1533-7.
14. Anonymus. Microbiology-General guidance for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*. International Organization for Standardization, ISO 10273. Genf, Schweiz: 1994

15. Äpfelbacher M, Trasak C, Wilharm G, Wiedemann A, Trulzsch K, Krauss K, et al. Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. J Biol Chem. 2003 29;278(35):33217-23.
16. Arnold T, Hensel A, Hagen R, Aleksic S, Neubauer H, Scholz HC. A highly specific one-step PCR-assay for the rapid discrimination of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* from pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. Syst Appl Microbiol. 2001;(24):285-9.
17. Agrain C, Sorg I, Paroz C, Cornelis GR. Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. Mol Microbiol. 2005;57(5):1415-27.
18. Aulisio CC, Mehlman IJ, Sanders AC. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. Appl Environ Microbiol. 1980;(39):135-40.
19. Bartling C, Truyen U, Isa G, Neubauer H. Untersuchung zur Prävalenz *Yersinia*-spezifischer Antikörper bei Rindern in Bayern. (2004a) Berl Münch Tierärztl Wschr. 2004;117:499-507.
20. Bartling C, Wolfel R, Nikolaou K, Petry T, Thiede S, Hildebrandt T, et al. Prevalence of anti-*Yersinia* antibodies in European brown hares in North-Rhine-Westphalia, Germany. (2004b) Dtsch Tierärztl Wochenschr. 2004;111(6):259-60, 262-4.
21. Benner GE, Andrews GP, Byrne WR, Strachan SD, Sample AK, Heath DG, et al. Immune response to *Yersinia* outer proteins and other *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice. Inf Imm. 1999;67(4):1922-8.
22. Bercovier H, Brenner J, Ursing J, Steigerwalt AG, Fanning GR, Alonso J, et al. (1980a) Characterization of *Yersinia enterocolitica* sensu stricto. Curr Microbiol. 1980;4:201-6.
23. Bercovier H, Ursing J, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Fanning GR, Carter GP, et al. (1980b) *Yersinia kristensenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of sucrose-negative strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr Microbiol. 1980;4:219-24.
24. Bercovier H, Steigerwalt AG, Guiyoule A, Huntley-Carter G, Brenner DJ. *Yersinia aldovae* (formerly *Yersinia enterocolitica*-like group X2): a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from aquatic ecosystem. Int J Syst Bacteriol. 1984;34:1166-72.
25. Bergman T, Hakansson S, Forsberg A, Norlander L, Macellaro ABA, Bolin I, et al. Analysis of the V-Antigen lcrGVH-yopBD operon of *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for a regulatory role of LcrH and LcrV. J Bacteriol. 1991;173:1607-16.
26. Bergman T, Erickson K, Galyov E, Persson C, Wolf-Watz H. The lcrB (yscN/U) gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in Yop secretion and shows high homology to the spa gene clusters of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol. 1994;176(9):2619-26.
27. Birtalan SC, Phillips RM, Ghosh P. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. Mol Cell. 2002;9(5):971-80.
28. Black DS, Bliska JB. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. EMBO J. 1997;16(10):2730-44.

29. Black DS, Bliska JB. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol.* 2000;37(3):515-27.
30. Blais BW, Phillippe LM. Comparative analysis of yadA and ail polymerase chain reaction methods for virulent *Yersinia enterocolitica*. *Food Control.* 1995;6(4):211-4.
31. Bleves S, Cornelis GR. How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. *Microbes Infect.* 2000;2(12):1451-60.
32. Bliska JB, Falkow S. Bacterial resistance to complement killing mediated by the ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:3561-65.
33. Bliska JB, Black DS. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect Immun.* 1995;63(2):681-5.
34. Bliska JB. Yop effectors of *Yersinia* spp. and actin rearrangements. *Trends Microbiol.* 2000;8(5):205-8.
35. Blocker A, Jouihri N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, et al. Structure and composition of the *Shigella flexneri* 'needle complex', a part of its type III secreton. *Mol Microbiol.* 2001;39(3):652-63.
36. Boland A, Sory MP, Iriarte M, Kerbouch C, Wattiau P, Cornelis GR. Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J.* 1996;15(19):5191-201.
37. Boland A, Havaux S, Cornelis GR. Heterogeneity of the *Yersinia* YopM protein. *Microb Pathog.* 1998;25(6):343-8.
38. Boland A, Cornelis GR. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia enterocolitica* infection. *Infect Immun.* 1998;66:1878-84.
39. Bölin I, Norlander L, Wolf-Watz H. Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun.* 1982;37:506-12.
40. Bölin I, Portnoy DA, Wolf-Watz H. Expression of the temperature-inducible outer membrane proteins of *Yersiniae*. *Infect Immun.* 1985;48(1):234-40.
41. Bonardi S, Brindani F, Pizzin G, Lucidi L, D'Incau M, Liebana E, et al. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *Int J Food Microbiol.* 2003;15,85(1-2):101-10.
42. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: The carisma continues. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:257-76.
43. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection.* 1999;1:323-33.
44. Boyd AP, Grosdent N, Totemeyer S, Geuijen C, Bleves S, Iriarte M, et al. *Yersinia enterocolitica* can deliver Yop proteins into a wide range of cell types: development of a delivery system for heterologous proteins. *Eur J Cell Biol.* 2000;79(10):659-71.

45. Boyd AP, Lambermont I, Cornelis GR. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. J Bacteriol. 2000;182(17):4811-21.
46. Brenner DJ, Bercovier H, Ursing J, Alonso JM, Steigerwalt AG, Fanning GR, et al. *Yersinia intermedia*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive, melibiose-positive and raffinose-positive strains. Curr Microbiol. 1980;4:207-12.
47. Brubaker RR. The Vwa⁺ virulence factor of *Yersiniae*: the molecular basis of the attendant nutritional requirement for Ca⁺⁺. Rev Infect Dis. 1983;4:748-58.
48. Bucher M, Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A. (2002a) Vorkommen von Yersinien-Arten in Kälbern und Jungrindern. Fleischwirtschaft. 2002;9:125-7.
49. Bucher M, Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A. (2002b) Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Puten. 43. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen 2002.
50. Burrows TW, Bacon GA. The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence. Br J Exp Pathol. 1956;37:481-93.
51. Carniel E. Chromosomal Virulence Factors of *Yersinia*. Contrib Microbiol Immunol. 1995;13:218-24.
52. Caroff M, Bundle DR, Perry MB. Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. Eur J Biochem. 1984;139(1):195-200.
53. Chatzipanagiotou S, Ladis V, Berdousi H, Palamidou F, Kourti E, Kattamis C. Prevalence of *Yersinia* plasmid-encoded outer protein (Yop) class-specific antibodies in multitransfused Greek patients with thalassemic syndromes. Clin Microbiol Infect. 1999;2:67-72.
54. Cheng LW, Schneewind O. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: on the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells. J Biol Chem. 1999;274(31):22102-8.
55. Christensen SG. The *Yersinia enterocolitica* situation in Denmark. Contr Microbiol Immunol. 1987;9:93-7.
56. Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, et al. The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:1315-52.
57. Cornelis GR. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. J Cell Biol. 2002;158(3):401-8.
58. Cornelis GR. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3(10):742-52.
59. Cox NA, Bailey JS. Comparison of enrichment and plating media for isolation of *Yersinia*. Poultry Sci. 1990;69:686-93.
60. Day JB, Plano GV. The *Yersinia pestis* YscY protein directly binds YscX, a secreted component of the type III secretion machinery. J Bacteriol. 2000;182(7):1834-43.
61. De Boer E, Nouws JFM. Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Int J Food Microbiol. 1991;12:375-8.

62. De Giusti M, de Vito E, Serra A, Quattrucci B, Boccia A, Pacifico L, et al. Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pigs and pork products. *Contr Microbiol Immunol*. 1995;13:126-9.
63. De Koning-Ward TF, Ward AC, Robins-Browne RM. Characterisation of the urease-encoding gene complex of *Yersinia enterocolitica*. *Gene*. 1994;145:25-32.
64. De Koning-Ward TF, Robins-Browne RM. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*. 1995;63:3790-5.
65. Dedie K, Bockemühl J, Kühn H. Bakterielle Zoonosen bei Mensch und Tier. Stuttgart: Thieme; 1993.
66. Delor I, Cornelis GR. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun*. 1992;60:4269-77.
67. Denecker G, Declercq W, Geuijen CA, Boland A, Benabdillah R, Van Gurp M, et al. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J Biol Chem*. 2001;276:19706-14.
68. Denecker G, Töttemeyer S, Mota LJ, Troisfontaines P, Lambermont I, Youta C, et al. Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun*. 2002;70:3510-20.
69. Donovan RS, Robinson CW, Glick BR. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol*. 1996;16(3):145-54.
70. Dubendorff JW, Studier FW. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol*. 1991;219(1): 45-59.
71. Dukuzumuremyi JM, Rosqvist R, Hallberg B, Akerstrom B, Wolf-Watz H, Schesser K. The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem*. 2000;275(45):35281-90.
72. Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Prot Expr Purif*. 2004;37(1):203-6.
73. Edqvist PJ, Olsson J, Lavander M, Sundberg L, Forsberg A, Wolf-Watz H, et al. YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J Bacteriol*. 2003;185(7):2259-66.
74. European Food Safety Authority. *Yersinia*. In: Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. EFSA. 2006: pp. 155-62.
75. Evdokimov AG, Anderson DE, Routzahn KM, Waugh DS. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J Mol Biol*. 2001;312(4):807-21.
76. Ewing WH, Ross AJ, Brenner DJ, Fanning GR. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. *Int J Syst Bact*. 1978;28:37-44.

77. Fallman M, Andersson K, Hakansson S, Magnusson KE, Stendahl O, Wolf-Watz H. *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect Immun.* 1995;63(8):3117-24.
78. Feldman MF, Muller S, Wuest E, Cornelis GR. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol.* 2002;46(4): 1183-97.
79. Fernandez-Lago L, Gomez M, Vizcaino N, Chordi A. Analysis of the immune response to *Yersinia enterocolitica* serotype-O:9-released proteins by immunoblot and ELISA. *Res Microbiol.* 1994;145:553-61.
80. Fields KA, Plano GV, Straley SC. A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the lcrB region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* 1994;176(3):569-79.
81. Fields KA, Straley SC. LcrV of *Yersinia pestis* enters infected eukaryotic cells by a virulence plasmid-independent mechanism. *Infect Immun.* 1999;67(9):4801-13 .
82. Fields KA, Nilles ML, Cowan C, Straley SC. Virulence role of V-antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect Immun.* 1999;67(10):5395-408.
83. Forsberg A, Viitanen AM, Skurnik M, Wolf-Watz H. The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol.* 1991;5(4):977-86.
84. Foultier B, Troisfontaines P, Müller S, Opperdoes F, Cornelis GR. Characterization of the ysa pathogenicity locus in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion systems. *J Mol Evol.* 2002;55(1):37-51.
85. Foultier B, Troisfontaines P, Vertommen D, Marenne MN, Rider M, Parsot C, et al. Identification of substrates and chaperone from the *Yersinia enterocolitica* 1B Ysa type III secretion system. *Infect Immun.* 2003;71(1):242-53.
86. Francis MS, Wolf-Watz H, Forsberg A. Regulation of type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(2):166-72.
87. Frederiksen W. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella X*). 14th Scand. Congr. Pathol. Microbiol.; Oslo; 1964.
88. Fredriksson-Ahomaa M, Hielm S, Korkeala H. High prevalence of yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland. *J Food Prot.* 1999;62:123-7.
89. Fredriksson-Ahomaa M, Bucher M, Stolle A. (2000a) Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4O:3 in pig tonsils and faeces samples. Proceedings 41. Arbeitstagung DVG Fachgruppe Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen. 2000;116-121.
90. Fredriksson-Ahomaa M, Korte T, Korkeala H. (2000b) Contamination of carcasses, offals, and the environment with yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse. *J Food Prot.* 2000;63:31-5.
91. Fredriksson-Ahomaa M, Björkroth J, Hielm S, Korkeala H. (2000c) Prevalence and characterisation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils from different slaughterhouses. *Food Microbiol.* 2000;17:3-101.

92. Fredriksson-Ahomaa M, Hallanvuo S, Korte T, Siitonen A, Korkeala H. (2001a) Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strains from human and porcine sources. *Epidem Infect.* 2001;127:37-47.
93. Fredriksson-Ahomaa M, Bucher M, Hank C, Stolle A, Korkeala H. (2001b) High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4O:3 on pig offal in Southern Germany: a slaughter technique problem. *Syst Appl Microbiol.* 2001;24:457-63.
94. Fredriksson-Ahomaa M, Korte T, Korkeala H. (2001c) Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork. *Lett Appl Microbiol.* 2001;32(6):375-8.
95. Fredriksson-Ahomaa M, Koch U, Klemm C, Bucher M, Stolle A. Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area. *Int J Food Microbiol.* 2004;95:89-94.
96. Frithz-Lindsten E, Rosqvist R, Johansson L, Forsberg A. The chaperone-like protein YerA of *Yersinia pseudotuberculosis* stabilizes YopE in the cytoplasm but is dispensable for targeting to the secretion loci. *Mol Microbiol.* 1995;16(4):635-47.
97. Fu Y, Galan JE. A Salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature.* 1999;401(6750):293-7.
98. Fukushima H, Maruyama K, Omori I, Ito K, Iorihara M. Contamination of pigs with *Yersinia* at the slaughterhouse. *Fleischwirtschaft.* 1990;70:1300-02.
99. Gaede K, Mack D, Heesemann J. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rats: analysis of the immune response to plasmid-encoded antigens of arthritis-susceptible Lewis rats and arthritis-resistant Fischer rats. *Med Microbiol Immunol.* 1992;181(3):165-72.
100. Galan J, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* 1999;284(5418):1322-8.
101. Galanakis E, Perdikogianni C, Maraki S, Giannoussi E, Kalmanti M, Tselentis Y, et al. Childhood *Yersinia enterocolitica* infection in Crete. *Eur J Clin Microbial Infect Dis.* 2006;25:65-6.
102. Galyov EE, Hakansson S, Forsberg A, Wolf-Watz H. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature.* 1993;361(6414):730-2.
103. Gaston JS, Cox C, Granfors K. Clinical and experimental evidence for persistent *Yersinia* infection in Reactive Arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42(10):2239-42.
104. Gemski P, Lazere JR, Casey T. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* 1980;17:682-5.
105. Goehring UM, Schmidt G, Pederson KJ, Aktories K, Barbieri JT. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem.* 1999;274(51):36369-72.
106. Granfors K, Jalkanen S, von Essen R, Lahesmaa-Rantala R, Isomaki O, Pekkola-Heino K, et al. *Yersinia* antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. *N Engl J Med.* 1989;320(4):216-21.

107. Gripenberg-Lerche C, Zhang L, Ahtonen P, Toivanen P, Skurnik M. Construction of urease-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:8: role of urease in virulence and arthritogenicity. *Infect Immun*. 2000;68:942-7.
108. Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP, Cornelis GR. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun*. 2002;70(8):4165-76.
109. Guan KL, Dixon JE. Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J Biol Chem*. 1991;266(26):17026-30.
110. Gürtler M, Alter T, Kasimir S, Linnebur M, Fehlhaber K. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs. *J Food Prot*. 2005;68(4):850-4.
111. Hakansson S, Bergman T, Vanooteghem JC, Cornelis GR, Wolf-Watz H. YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infect Immun*. 1993;61(1):71-80.
112. Hakansson S, Galyov EE, Rosqvist R, Wolf-Watz H. The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol*. 1996;20(3):593-603.
113. Hakansson S, Schesser K, Persson C, Galyov EE, Rosqvist R, Homble F. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J*. 1996;15(21):5812-23.
114. Haller JC, Carlson S, Pederson KJ, Pierson DE. A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol Microbiol*. 2000;36(6):1436-46.
115. Hamid N, Gustavsson A, Andersson K, McGee K, Persson C, Rudd CE, et al. YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb Pathog*. 1999;27(4):231-42.
116. Hank C. Ein Beitrag zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Hackfleisch und Fleischerzeugnissen vom Schwein im Hinblick auf die eingesetzten Kultur- und Isolierungsverfahren [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2003.
117. Hannu T, Inman R, Granfors K, Leirisalo-Repo M. Reactive arthritis or post-infectious arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(3):419-33.
118. Hanski C, Kutschka V, Schmoranz HP, Naumann M, Stallmach A, Hahn H, et al. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect Immun*. 1989;57:673-8.
119. Hartland EL, Bordun AM, Robins-Browne RM. Contribution of YopB to virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*. 1996;64(6):2308-14.
120. Head CB, Whitty DA, Ratnam S. Comparative study of selective media for recovery of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol*. 1982;16:615-21.
121. Heesemann J, Keller C, Morawa R, Schmidt N, Siemens HJ, Laufs R. Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis*. 1983;147:107-15.

122. Heesemann J, Gross U, Schmidt N, Laufs R. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect Immun.* 1986;54(2):561-7.
123. Heesemann J, Eggers C, Schröder J. Serological diagnosis of yersiniosis by immunoblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic *Yersiniae*. *Contrib Microbiol Immunol.* 1987;9:285-9.
124. Heesemann J, Schröder J, Ulrich M. Analysis of the class-specific immune response to *Yersinia enterocolitica* virulence-associated antigens in oro-gastrically infected rabbits. *Microb Pathog.* 1988;5(6):437-47.
125. Heesemann J. Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden. *Immun Infekt.* 1990;18:186-91.
126. Heesemann J. Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. In: Brandes H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G, Editoren. *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag; 1994. p. 425-36.
127. Heesemann J, Karch H. Diagnostik von Yersiniosen und Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). *Internist.* 1995;36:102-5.
128. Hensel A, Nikolaou K, Bartling C, Petry T, Arnold T, Rösler U, et al. Zur Prävalenz von Anti-*Yersinia*-Outer-Protein-Antikörpern bei Schlachtschweinen in Bayern. *Berl Münch Tierärztl Wschr.* 2004;117:30-8.
129. Herrlinger JD, Asmussen JU. Long term prognosis in *Yersinia* arthritis: clinical and serological findings. *Ann Rheum Dis.* 1992;51(12):1332-4.
130. Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* 2000;19(22):5989-99.
131. Hoiczky E, Blobel G. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(8):4669-74.
132. Holmström A, Olsson J, Cherepanov P, Maier E, Nordfelth R, Pettersson J, et al. LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol.* 2001;39(3):620-32.
133. Hoogkamp-Korstanje J, De Koning J, Heesemann J. Persistence of *Yersinia enterocolitica* in Man. *Infect.* 1988;16(2):81-5.
134. Hoogkamp-Korstanje J, De Koning J. Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia enterocolitica*-Infektionen. *Immun Infekt.* 1990;18:192-7.
135. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(2):379-433.
136. Huppertz HI, Heesemann J. Experimental *Yersinia* infection of human synovial cells: persistence of live bacteria and generation of bacterial antigen deposits including 'ghosts,' nucleic acid-free bacterial rods. *Infect Immun.* 1996;64(4):1484-7.
137. Ibrahim A, Goebel BM, Liesack W, Griffiths M, Stackebrandt E. The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol Lett.* 1993;114(2):173-7.

138. Iriarte M, Sory MP, Boland A, Boyd AP, Mills SD, Lambermont I, et al. TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.* 1998;17(7):1907-18.
139. Iriarte M, Cornelis GR. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol.* 1998;29(3):915-29.
140. Iriarte M, Cornelis GR. Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia* yop virulon. *J Bacteriol.* 1999;181(2):675-80.
141. Jackson MW, Plano GV. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;186(1):85-90.
142. Jones TF, Buckingham SC, Bopp CA, Ribot E, Schaffner W. From Pig to Pacifier: Chitterling-Associated Yersiniosis Outbreak among Black Infants. *Emerging Infectious Diseases.* 2003;9(8):1007-9.
143. Juris SJ, Rudolph AE, Huddler D, Orth K, Dixon JE. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(17):9431-6.
144. Kapperud G, Namork E, Skurnik M, Nesbakken T. Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP 1 and possible importance for pathogenesis. *Infect Immun.* 1987;55:2247-54.
145. Kapperud G. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int J Food Microbiol.* 1991;(12):53-66.
146. Kapperud G, Vardund T, Skjerve E, Hornes E, Michaelsen TE. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:2938-44.
147. Kimbrough TG, Miller SI. Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(20): 11008-13.
148. Klein HG, Dodd RY, Ness PM, Fratantoni JA, Nemo GJ. Current status of microbial contamination of blood components: summary of a conference. *Transfusion.* 1997;37(1):95-101.
149. Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci.* 1994;19(10):415-21.
150. Koehler KM, Lasky T, Fein SB, DeLong SM, Hawkins MA, Rabatsky-Ehr T, et al. Population-based incidence of infection with selected bacterial enteric pathogens in children younger than five years of age, 1996-1998. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25:129-34.
151. Koster M, Bitter W, de Cock H, Allaoui A, Cornelis GR, Tommassen J. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol.* 1997;26(4):789-97.
152. Kroll DJ, Abdel-Malek Abdel-Hafiz H, Marcell T, Simpson S, Chen CY, Gutierrez-Hartmann A, et al. A multifunctional prokaryotic protein expression system: overproduction, affinity purification, and selective detection. *DNA Cell Biol.* 1993;12(5):441-53.

153. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, et al. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*. 1998;280(5363):602-5.
154. Kwaga JK, Iversen JO, Misra V. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled polynucleotide probes. *J Clin Microbiol*. 1992;30:2668-73.
155. Langer HE. Yersinien-Infektion: Wie wird sie nachgewiesen? *Rheuma-online*; 2002. Available from: URL: <http://www.rheuma-online.de>
156. Leclercq A, Martin L, Laporte Vergnes M, Ounnoughenne N, Laran J, Giraud P, et al. Fatal *Yersinia enterocolitica* biotype 4 serovar O:3 sepsis after red blood cell transfusion. *Transfusion*. 2005;45:814-8.
157. Lee VT, Tam C, Schneewind O. LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J Biol Chem*. 2000;(47):36869-75.
158. Lee VT, Mazmanian SK, Schneewind O. A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reactions is activated by specific signals. *J Bacteriol*. 2001;183(17):4970-8.
159. Lehmann KB, Neumann R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. München: J. F. Lehmann, 1896.
160. Leung KY, Straley SC. The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J Bacteriol*. 1989;171(9):4623-32.
161. Leung KY, Reisner BS, Straley SC. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun*. 1990;58(10):3262-71.
162. Lloyd SA, Norman M, Rosqvist R, Wolf-Watz H. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol*. 2001;39(2):520-31.
163. Lo SH, Chen LB. Focal adhesion as a signal transduction organelle. *Cancer Metastasis Rev*. 1994;13(1):9-24.
164. Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnel JE. In integrative and specialized cellular activities. In: Darnel JE, editor. *Molecular cell biology*. New York: Scientific American Books Inc.; 1995. p. 850-1342.
165. Logsdon L, Mecsas J. Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in Kolonization and persistence in intestinal and lymph tissues. *Infect Immun*. 2003;71(8):4595-607.
166. Logsdon L, Mecsas J. The proinflammatory response induced by wild-type *Yersinia pseudotuberculosis* infection inhibits survival of yop mutants in the gastrointestinal tract and Peyer's patches. *Infect Immun*. 2006;74(3):1516-27.
167. Mäki-Ikola O, Heesemann J, Toivanen A, Granfors K. High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany. *Rheumatol Int*. 1997;16:227-9.
168. Marenne M, Journet L, Mota LJ, Cornelis GR. Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb Pathog*. 2003;5:243-58.

169. Marg H, Scholz H, Arnold T, Roesler U, Hensel A. Influence of long-time transportation stress on reactivation of *Salmonella* Typhimurium DT104 in experimentally infected pigs. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2001;114:385-8.
170. Marston FAO. The purification of eucaryotic polypeptides expressed in *Escherichia coli*. In: DNA cloning: a practical approach. Glover DM, editor. Oxford: IRL Press, 1987.
171. McDonald C, Vacratsis PO, Bliska JB, Dixon JE. The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem.* 2003;20:18514-23.
172. McIver MA, Pike RM. Chronic glanders-like infection of face caused by an organism resembling *Flavobacterium pseudomallei* Whitmore. *Clinical miscellany.* 1934;1:16-21.
173. McNally A, Cheasty C, Fearnley C, Dalziel RW, Paiba GA, Manning G, et al. Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000. *Lett Appl Microbiol.* 2004;39:103-8.
174. Meijer LK, Schesser K, Wolf-Watz H, Sassone-Corsi P, Pettersson S. The bacterial protein YopJ abrogates multiple signal transduction pathways that converge on the transcription factor CREB. *Cell Microbiol.* 2000;2:231-8.
175. Michiels T, Cornelis GR. Nucleotide sequence and transcription analysis of yop51 from *Yersinia enterocolitica* W22703. *Microb Pathog.* 1988;5(6):449-59.
176. Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM, Cornelis GR. Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. *Infect Immun.* 1990;58(9):2840-9.
177. Michiels T, Vanooteghem JC, Lambert de Rouvroit C, China B, Gustin A, Boudry P, et al. Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* 1991;173(16):4994-5009.
178. Mikulskis AV, Delor I, Thi VH, Cornelis GR. Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol Microbiol.* 1994;14(5):905-15.
179. Miller VL, Farmer JJ, Hill WE, Falkow S. The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun.* 1989;57:121-31.
180. Mills SD, Boland A, Sory MP, Van der Smissen P, Kerbouch C, Finlay BB, et al. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:12638-43.
181. Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high level. *J Mol Biol.* 1996;260(3):289-98.
182. Monack DM, Meccas J, Ghori N, Falkow S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:10385-90.
183. Monack DM, Meccas J, Bouley D, Falkow S. *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. *J Exp Med.* 1998;188:2127-37.

184. Mota LJ, Journet L, Sorg I, Cornelis GR. Bacterial injectisomes: Needle length does matter. *Science*. 2005;307:1278.
185. Mueller CA, Broz P, Müller SA, Ringler P, Erne-Brand F, Sorg I, et al. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of the injectisome needle. *Science*. 2005;310:674-6.
186. Mulder B, Michiels T, Simonet M, Sory MP, Cornelis GR. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun*. 1989;57(8):2534-41.
187. Muto O, Osawa S. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(1):166-9.
188. Nakajima H, Inoue M, Mori T, Itoh K, Arakawa E, Watanabe H. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *J Clin Microbiol*. 1992;30:2484-6.
189. Nakajima R, Motin VL, Brubaker RR. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect Immun*. 1995;63:3021-9.
190. Nattermann H, Horsch F, Dee W, Ortmann G. Die *Yersinia enterocolitica*-Infektion bei landwirtschaftlichen Nutztieren. *Mh Vet-Med*. 1986;41:23-6.
191. Nedialkov YA, Motin VL, Brubaker RR. Resistance to lipopolysaccharide mediated by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10. *Infect Immun*. 1997;65:1196.
192. Nesbakken T, Nerbrink E, Rotterud OJ, Borch E. Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria* spp. on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter. *Int J Food Microbiol*. 1994;23:197-208.
193. Nesbakken T, Eckner K, Hoidal HK, Rotterud OJ. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. *Int J Food Microbiol*. 2003;80(3):231-40.
194. Neubauer H, Reischl U, Kostler J, Aleksic S, Finke EJ, Meyer H. Variations in the 16S rRNA gene sequence of *Yersinia enterocolitica* isolates influence the specificity of molecular identification systems. *Zentralbl Bakteriol*. 1999;289(3):329-37.
195. Neubauer H, Hensel A, Aleksic S, Finke EJ, Meyer H. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three different homology clusters. *Int J Med Microbiol*. 2000;290:61-4.
196. Neubauer H, Sprague LD, Scholz H, Hensel A. Die Diagnostik der *Yersinia enterocolitica*-Infektionen: Eine Übersicht über klassische Nachweistechiken und neue molekularbiologische Methoden. *Berl Münch Tierarztl Wochenschr*. 2001;114:1-7.
197. Neyt C, Cornelis GR. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol*. 1999;33(5):971-81.
198. Nielsen B, Heisel C, Wingstrand A. Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica* O:3 in experimentally infected pigs. *Vet Microbiol*. 1996;48:293-303.

199. Nikolaou K, Hensel A, Bartling C, Tomaso H, Arnold T, Rösler U, et al. Prevalence of anti-*Yersinia* outer protein antibodies in goats in Lower Saxony. *J Vet Med B*. 2005;52:17-24.
200. Nilles ML, Williams AW, Skrzypek E, Straley SC. *Yersinia pestis* LcrV forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low Ca^{2+} -response. *J Bacteriol*. 1997;179:1307-16.
201. Nimri LF, Meqdam M. Enteropathogens associated with cases of gastroenteritis in a rural population in Jordan. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:634-9.
202. Nordic Committee on Food Analysis. *Yersinia enterocolitica*. Detection in foods. Method no. 117. Espoo, Finland: 1996.
203. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000;405(6784):299-304.
204. Orth K, Palmer LE, Bao ZQ, Stewart S, Rudolph AE, Bliska JB, et al. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science*. 1999;285:1920-3.
205. Orth K. Function of the *Yersinia* effector YopJ. *Curr Op in Microbiol*. 2002;5:38-43.
206. Ostroff SM, Kapperud G, Hutwagner LC, Nesbakken T, Bean NH, Lassen J, et al. Sources of *Yersinia enterocolitica* infections in Norway: a prospective case-control study. *Epidemiol Infect*. 1994;112:133-41.
207. Paerregard A, Espersen F, Jensen OM, Skurnik M. Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect Immun*. 1991;59:253-60.
208. Pai CH, Mors V. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*. 1978;19:908-11.
209. Pai CH, Sorger S, Lafleur L, Lackman L, Marks M. Efficacy of cold enrichment techniques for recovery of *Yersinia enterocolitica* from human stools. *J Clin Microbiol*. 1979;9:712-5.
210. Palmer LE, Hobbie S, Galan JE, Bliska JB. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF α production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol*. 1998;27:953-65.
211. Pan SH, Malcolm BA. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21(DE3). *Biotechniques*. 2000;29(6):1234-8.
212. Payne PL, Straley SC. YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *J Bacteriol*. 1998;180(15):3882-90.
213. Payne PL, Straley SC. YscP of *Yersinia pestis* is a secreted component of the Yop secretion system. *J Bacteriol*. 1999;181(9):2852-62.
214. Pelludat C, Hogardt M, Heesemann J. Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect Immun*. 2002;70(4):1832-41.

215. Pepe JC, Miller VL. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:6473-7.
216. Pepe JC, Badger JL, Miller VC. Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. Mol Microbiol. 1994;11:123-35.
217. Pepe JC, Wachtel MR, Wagar E, Miller VL. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. Infect Immun. 1995;63:4837-48.
218. Persson C, Carballeira N, Wolf-Watz H, Fallman M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. EMBO J. 1997;16(9):2307-18.
219. Pettersson J, Nordfelth R, Dubinina E, Bergman T, Gustafsson M, Magnusson KE, et al. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. Science. 1996; 273(5279):1231-3.
220. Pettersson J, Holmstrom A, Hill J, Leary S, Frithz-Lindsten E, von Euler-Matell A, et al. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. Mol Microbiol. 1999;32(5):961-76.
221. Pfeiffer A. Über die bacilläre Pseudotuberkulose bei Nagethieren. Leipzig: Verlag Georg Thieme, 1889:1-42.
222. Pierson DE, und Falkow S. The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. Infect Immun. 1993;61:1846-52.
223. Plano GV, Barve SS, Straley SC. LcrD, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response. J Bacteriol. 1991;173(22):7293-303.
224. Plano GV, Straley SC. Mutations in *yscC*, *yscD*, and *yscG* prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*. J Bacteriol. 1995;177(13):3843-54.
225. Portnoy DA, Moseley SL, Falkow S. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. Infect Immun. 1981;31:775-82.
226. Reithmeier-Rost D. Immunmodulation durch Interaktion des *Yersinia enterocolitica* V-Antigens mit Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Universität Regensburg: 2005.
227. Robert Koch Institut. Darminfektionen (Gastroenteritiden) - 1. Folge. Epid Bull. 2000;23.
228. Robert Koch Institut. (2002a) Fallbericht: Enteritis durch *Yersinia enterocolitica* Serogruppe O:8, Biovar 1B. Epid Bull. 2002;27:221-2.
229. Robert Koch Institut. (2002b) Zur Situation bei wichtigen Gastroenteritiden in Deutschland 2001. Yersiniose. Epid Bull. 2002;50:417-22.
230. Robert Koch Institut. Epidemiologie spezifischer Krankheiten: Yersiniose. In: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002. Berlin 2003. p. 151-4.
231. Robert Koch Institut. (2004a) Yersiniose. In: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003. Berlin 2004. p. 159-62.

232. Robert Koch Institut. (2004b) Bakterielle Gastroenteritiden: Situationsbericht 2003. *Epid Bull.* 2004;31:251-4.
233. Robert Koch Institut. (2004c) Fallberichte: Enteritis durch *Yersinia enterocolitica*, Serogruppe O:8, Biovar 1B. *Epid Bull.* 2004;43:369-70.
234. Robert Koch Institut. Yersiniose. In: *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004.* Berlin 2005. p. 168-71.
235. Robins-Browne RM, Bordun AM, Slee KJ. Serological response of sheep to plasmid-encoded proteins of *Yersinia* species following natural infection with *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. *J Med Microbiol.* 1993;39(4):268-72.
236. Roggenkamp A, Ruckdeschel K, Leitritz L, Schmitt R, Heesemann J. Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun.* 1996;64(7):2506-14.
237. Rosqvist R, Forsberg A, Rimpilainen M, Bergman T, Wolf-Watz H. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol Microbiol.* 1990;4(4):657-67.
238. Rosqvist R, Forsberg A, Wolf-Watz H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun.* 1991;59(12):4562-9.
239. Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* 1994;13(4):964-72.
240. Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun.* 1996;64(3):724-33.
241. Ruckdeschel K, Machold J, Roggenkamp A, Schubert S, Pierre J, Zumbihl R, et al. *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production. *J Biol Chem.* 1997;272:15920-7.
242. Ruckdeschel K, Harb S, Roggenkamp A, Hornef M, Zumbihl R, Kohler S, et al. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappa B: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med.* 1998;187:1069-79.
243. Ruckdeschel K, Mannel O, Richter K, Jacobi CA, Trulzsch K, Rouot B, et al. *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol.* 2001;166:1823-31.
244. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Harvesting and lysis of the bacteria. In: *Molecular Cloning.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:p.1.22.
245. Sauvonnnet N, Pradet-Balade B, Garcia-Sanz JA, Cornelis GR. 2002a. Regulation of mRNA expression in macrophages following *Yersinia enterocolitica* infection: role of different Yop effectors. *J Biol Chem.* 2002;277:25133-42.
246. Sauvonnnet N, Lambermont P, Van der Bruggen P, Cornelis GR. 2002b. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and t-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Microbiol.* 2002;45(3):805-15.

247. Schesser K, Spiik AK, Dukuzumuremyi JM, Neurath MF, Petterson S, Wolf-Watz H. The YopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol.* 1998;28:1067-79.
248. Schiemann DA. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can J Microbiol.* 1979;25:1298-304.
249. Schiemann DA. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1989.
250. Schleifstein J, Coleman MB. An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis* and pathogenic for man. *NY State J Med.* 1939;39:1749-53.
251. Schmiel DH, Wagar E, Karamanou L, Weeks D, Miller VL. Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect Immun.* 1998;66(8):3941-51.
252. Schmiel DH, Young GM, Miller VL. The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene yplA is part of the flagellar regulon. *J Bacteriol.* 2000;182(8):2314-20.
253. Schoenwaelder SM, Burrridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(2):274-86.
254. Schotte P, Denecker G, Van Den Broeke A, Vandenabeele P, Cornelis GR, Beyaert R. Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits Caspase-1-mediated maturation and release of Interleukin-1 β . *J Biol Chem.* 2004;279(24):25134-42.
255. Seidler T, Alter T, Kruger M, Fehlhäber K. Transport stress - consequences for bacterial translocation, endogenous contamination and bactericidal activity of serum of slaughter pigs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001;114(9-10):375-7.
256. Shao F, Merritt PM, Bao Z, Innes RW, Dixon JE. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell.* 2002;109(5):575-88.
257. Sing A, Roggenkamp A, Geiger AM, Heesemann J. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10 deficient mice. *J Immunol.* 2002;168:1315-21.
258. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Bioscience Bioeng.* 2005;99(4):303-10.
259. Skjerve E, Lium B, Nielsen B, Nesbakken T. Control of *Yersinia enterocolitica* in pigs at herd level. *Int J Food Microbiol.* 1998;45:195-203.
260. Skrzypek E, Straley SC. LcrG, a secreted protein involved in negative regulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* 1993;175(175):2530-42.
261. Skurnik M, Nurmi T, Granfors K, Korkela M, Tiilikainen AS. Plasmid associated antibody production against *Yersinia enterocolitica* in man. *Scand J Infect Dis.* 1983;15:173-7.
262. Skurnik M, Wolf-Watz H. Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol.* 1989;3:517-29.

263. Skurnik M, el Tahir Y, Saarinen M, Jalkanen S, Toivanen P. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect Immun.* 1994;62(4):1252-61.
264. Skurnik M. Role of YadA in *Yersinia enterocolitica*-induced reactive arthritis: a hypothesis. *Trends Microbiol.* 1995;3:318-9.
265. Skurnik M, Venho R, Bengoechea JA, Moriyon I. The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. *Mol Microbiol.* 1999;31:1443-62.
266. Smith JE, Thal E. A taxonomic study of the genus *Pasteurella* using a numeral technique. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64: 213-23.
267. Sory MP, Cornelis GR. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol.* 1994;14(3):583-94.
268. Sory MP, Boland A, Lambermont I, Cornelis GR. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(26):11998-2002.
269. Sprague L, Neubauer H. *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55 (Pt 2):831-5.
270. Stahlberg TH, Granfors K, Toivanen A. Immunoblot analysis of human IgM, IgG and IgA responses to plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* serovar O:3. *J Med Microbiol.* 1987;2:157-63.
271. Stainier I, Iriarte M, Cornelis GR. YscM1 and YscM2, two *Yersinia enterocolitica* proteins causing downregulation of yop transcription. *Mol Microbiol.* 1997;26(4):833-43.
272. Stenhouse MAE, Milner LV. *Yersinia enterocolitica*: a hazard in blood transfusion. *Transfusion.* 1982;22:396-8.
273. Stolk-Engelaar VM, Hoogkamp-Korstanje JA. Clinical presentation and diagnosis of gastrointestinal infections by *Yersinia enterocolitica* in 261 Dutch patients. *Scand J Infect Dis.* 1996;28(6):571-5.
274. Straley SC, Plano GV, Skrzypek E, Haddix PL, Fields KA. Regulation by Ca^{2+} in the *Yersinia* low- Ca^{2+} response. *Mol Microbiol.* 1993;8(6):1005-10.
275. Studier FW. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol.* 1991;219(5):37-44.
276. Sukhan A, Kubori T, Wilson J, Galan JE. Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex. *J Bacteriol.* 2001;183(4):1159-67.
277. Takao T, Tominaga N, Yoshimura S, Shimonishi Y, Hara S, Inoue T, et al. Isolation, primary structure and synthesis of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Eur J Biochem.* 1985;152(1):199-206.
278. Tamm A, Tarkkanen AM, Korhonen TK, Kuusela P, Toivanen P, Skurnik M. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the

- virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol. 1993;10(5):995-1011.
279. Tardy F, Homble F, Neyt C, Wattiez R, Cornelis GR, Ruyschaert JM, et al. *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. EMBO J. 1999;18(23):6793-9.
280. Tauxe RV, Wauters G, Goossens V, Van Noyen R, Vandepitte J, Martin SM, et al. *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. Lancet. 1987;1:1129-32.
281. Tennant SM, Grant TH, Robins-Browne RM. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. FEMS Immun Med Microbiol. 2003;38:127-37.
282. Thibodeau V, Frost EH, Chenier S, Quessy S. Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally inoculated pigs and the tonsils and faeces of pigs at slaughter. Can J Vet Res. 1999;63:96-100.
283. Thibodeau V, Frost EH, Quessy S. Development of an ELISA procedure to detect swine carriers of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Veterinary Microbiology. 2001;82:249-59.
284. Thisted Lambertz S, Danielsson-Tham M. Identification and characterisation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. Appl Env Microbiol. 2005;71:3674-81.
285. Trülsch K, Sporleder T, Igwe E, Rüssmann H, Heesemann J. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. Infect Immun. 2004;72(9):5227-34.
286. Tzipori S, Robins-Browne R, Prpic J. Studies on the role of virulence determinants of *Yersinia enterocolitica* in gnotobiotic piglets. Contrib Microbiol Immunol. 1987;9:233-8.
287. Ursing J, Brenner DJ, Bercovier H, Fanning GR, Steigerwalt AG, Alonso JM, et al. *Yersinia frederiksenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive strains. Curr Microbiol. 1980;4:213-8.
288. Van Loghem JJ. The classification of plague bacillus. J Serol Microbiol. 1944;10:15-6.
289. Van Noyen R, Vandepitte J, Wauters G. Nonvalue of cold enrichment of stools for isolation of *Yersinia enterocolitica* serotypes 3 and 9 from patients. J Clin Microbiol. 1980;11:127-31.
290. Van Noyen R, Selderslaghs R, Wauters G, Vandepitte J. Comparative epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and related species in patients and healthy controls. Contrib Microbiol Immunol 1987; 9:61-7.
291. Verhaegen J, Charlier J, Lemmens P, Delmee M, Van Noyen R, Verbist L, et al. Surveillance of human *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium: 1967-1996. Clin Infect Dis. 1998;27:59-64.
292. Visser LG, Annema A, van Furth R. Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. Infect Immun. 1995;63(7): 2570-5.
293. Von Pawel-Rammingen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K, Wolf-Watz H, Rosqvist R. GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. Mol Microbiol. 2000;36(3):737-48.

294. Walker SJ, Gilmour A. A comparison of media and methods for the recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria from milk containing simulated raw milk microfloras. J Appl Bact. 1986;60:175-83.
295. Wattiau P, Cornelis GR. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. Mol Microbiol. 1993;8(1):123-31.
296. Wattiau P, Bernier B, Deslee P, Michiels T, Cornelis GR. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91(22):10493-7.
297. Wauters G. Improved methods for the isolation and the recognition of *Yersinia enterocolitica*. Contr Microbiol Immunol. 1973;2:68-70.
298. Wauters G. Carriage of *Yersinia enterocolitica* serotype 3 by pigs as a source of human infection. Contrib Microbiol Immunol. 1979;5:49-52.
299. Wauters G, Kondolo K, Janssens M. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. Contr Microbiol Immunol. 1987;9:14-21.
300. Wauters G, Janssens M, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. Int J Syst Bacteriol. 1988;38:424-9.
301. Wauters G, Goossens V, Janssens M, Vandepitte J. New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork Appl Environ Microbiol. 1988;54:851-4.
302. Weber A, Lembke C. Occurrence of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in cats. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1981;94(16):325-7.
303. Wenzel BE, Heesemann J, Wenzel KW, Scriba PC. Antibodies to plasmid-encoded proteins of enteropathogenic *Yersinia* in patients with autoimmune thyroid disease. Lancet. 1988;1:8575-6.
304. Wingstrand A, Dahl J, Bager F. Cross-sectional risk factor analysis for *Yersinia enterocolitica* O:3 in Danish slaughter pigs based on bacteriological data. Proceedings of the 4th International symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork, Salin pork 2001, 2-5 September 2001 in Leipzig, 2001;468-477.
305. Winstanley C, Hart CA. Type III secretion systems and pathogenicity islands. J Med Microbiol. 2001;50(2):116-26.
306. Wirsing Von König CH, Von König U. Serologie und Immunologie für MTA. Stuttgart: Thieme, 1988.
307. Woestyn S, Allaoui A, Wattiau P, Cornelis GR. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. J Bacteriol. 1994;176(6):1561-9.
308. Wolffs P, Knutsson R, Norling B, Radström P. Rapid Quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR. J Clin Microbiol. 2004;42(3):1042-7.
309. Wren BW, Tabaqchali S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. Lancet. 1990;336:693.

310. Wulff-Strobel CR, Williams AW, Straley SC. LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion. *Mol Microbiol.* 2002;43(2):411-23.
311. Wuorela M, Jalkanen S, Kirveskari j, Laitio P, Granfors K. *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 alters the expression of serological HLA-B27 epitopes on human monocytes. *Infect Immun.* 1997;65:2060-6.
312. Yao T, Mecsas J, Healy I, Falkow S, Chien Y. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, YopH. *J Exp Med.* 1999;190:1343-50.
313. Young GM, Schmiel DH, Miller VL. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(11):6456-61.
314. Young BM, Young GM. Evidence for targeting of Yop effectors by the chromosomally encoded Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* 2002;184(20):5563-71.
315. Young BM, Young GM. YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* 2002;184(5):1324-34.
316. Zhang ZY, Clemens JC, Schubert HL, Stuckey JA, Fischer MW, Hume DM, et al. Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem.* 1992;267(33):23759-66.
317. Zhang L, Radziejewska-Lebrecht J, Krajewska-Pietrasik D, Toivanen P, Skurnik M. Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Mol Microbiol.* 1997;23(1):63-76.
318. Zumbihl R, Aepfelbacher M, Andor A, Jacobi CA, Ruckdeschel K, Rouot B, et al. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem.* 1999;274(41):29289-93.

ANHANG

PCR-Ansatz zur Amplifikation der *Yop*-Gene

10 µl 10 x Reaktionspuffer (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot),
 10 µl 2mM dNTP-Mix (Fa. Hybaid, Franklin, USA),
 1 µl von jedem 100 µmol Primer (Fa. VBC Genomics, Wien, Österreich), siehe **Tabelle 3**
 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (Fa. Invitrogen, Karlsruhe),
 5-8 µl Template-DNA und H₂O_{bidest} ad 100 µl

Reagenzien für Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gel

	Agarose-Gel (1 %ig)	Agarose-Gel (2 %ig)
Agarose	3 g	6 g
Aqua dest	300 ml	600 ml

Tris-Boric Acid-EDTA (TBE)

Tris-Base	108 g
Borsäure	55 g
EDTA	8,5 g
Aqua bidest	ad 1 Liter

Diese Stocklösung 1:10 in Aqua bidest verdünnt ergibt die Gebrauchslösung.

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid	1 mg
Aqua bidest	400 ml

Pufferlösungen und Reagenzien für Gel-Elektrophorese und Immuno-Blot

Sammelgelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)

Tris	6 g
Aqua bidest	60 ml

Der pH-Wert wird mit HCl auf pH 6,8 eingestellt und die Lösung auf 100 ml mit Aqua bidest aufgefüllt.

Trenngelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)

Tris	54,45 g
Aqua dest	150 ml

Den pH-Wert mit HCl auf pH 8,8 einstellen und mit Aqua dest auf 300 ml auffüllen.

Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)

APS	10 % in Aqua bidest, vor dem Gebrauch frisch ansetzen
-----	---

Trenn- und Sammelgel

	Trenngel (15 %ig), 10 ml	Sammelgel (4 %ig), 5 ml
Aqua dest	24 ml	3,075 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	-
1,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	1,25 ml
20 % (w/vol) SDS-Lösung	500 µl	250 µl
Acrylamid/ Bis-Stammlösung	5,0 ml	670 µl
10 % (w/vol) APS-Lösung	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

SDS-Probenpuffer (8,0 ml) nach Lämmli

Aqua dest	3,0 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml
Glycerol	1,6 ml
10 % SDS (w/vol)	1,6 ml
β-Mercaptoethanol	0,4 ml
0,5 % Bromphenolblau (w/vol)	0,4 ml

Elektroden-Puffer

Tris	0,025 M (pH 8,3)
Glycin	0,192 M
SDS	1 % (w/vol)

Coomassieblau-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blau R250	1,25 g
Methanol	225 ml
Eisessig	50 ml
Aqua dest	225 ml

Coomassieblau-Entfärbelösung

Methanol	300 ml
Eisessig	100 ml
Aqua dest	600 ml

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 0,15 M, pH 7,4

NaCl	85,0 g
Na ₂ HPO ₄ (x 2H ₂ O)	14,8 g (18,56 g)
KH ₂ PO ₄	3,54 g
A. bidest	ad 1 Liter

Diese Stocklösung 1:10 in A. dest verdünnt, ergibt die Gebrauchslösung mit pH-Wert 7,2-7,4. Die Gebrauchslösung ist vor ihrem Einsatz zu autoklavieren.

PBS-Tween, 0,05 %ig

0,5 ml Tween 20 ad 1 Liter PBS

Puffer für die denaturierende Proteinreinigung**Puffer B (1Liter)**

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,8 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
10 mM TrisCl	1,2 g Tris base
8 M Urea	480,5 g
pH mit NaOH auf 8,0 einstellen	

Puffer C (1 Liter)

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,8 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
10 mM TrisCl	1,2 g Tris base
8 M Urea	480,5 g
pH mit HCl auf 6,3 einstellen	

Puffer D (1 Liter)

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,8 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
10 mM TrisCl	1,2 g Tris base
8 M Urea	480,5 g
pH mit HCl auf 5,9 einstellen	

Puffer E (1 Liter)

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,8 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
10 mM TrisCl	1,2 g Tris base
8 M Urea	480,5 g
pH mit HCl auf 4,5 einstellen	

Sörensen-Puffer

67mM Phosphatpuffer, pH 7,4	19,44 g Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O
	1,76 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	Aqua dest ad 1 l

Puffer zur Plasmid-Präparation (alkalische Lyse)

Puffer P1 = Resuspendierungspuffer	50 mM Tris-HCL, pH 8,0 10 mM EDTA RNase, 100 µg/ml
Puffer P2 = Lysepuffer	0,2 M NaOH 1 % SDS
Puffer P3 = Neutralisierungspuffer	3 M Kaliumacetat, pH 5,5